

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
UFVJM

MALU PEREIRA RIBEIRO

**ATIVIDADE ANTITUMORAL E ANTIMICROBIANA DE ALCALOIDES
BISBENZILISOQUINOLÍNICOS DE *Cissampelos sympodialis* Eichler
(Menispermaceae)**

DIAMANTINA - MG

2020

MALU PEREIRA RIBEIRO

**ATIVIDADE ANTITUMORAL E ANTIMICROBIANA DE ALCALOIDES
BISBENZILISOQUINOLÍNICOS DE *Cissampelos sympodialis* Eichler
(Menispermaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, nível de Mestrado da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas – Biociências e Biotecnologia Aplicadas às Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira

DIAMANTINA- MG

2020

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

R484a

Ribeiro, Malu Pereira

Atividade antitumoral e antimicrobiana de alcaloides bisbenziliso-quinolínicos de *Cissampelos sympodialis* Eichler (menispermaceae) / Malu Pereira Ribeiro , 2020.

123 p.: il.

Orientador: Eduardo de Jesus Oliveira

Dissertação (Mestrado– Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2020.

1. *Cissampelos sympodialis*. 2. Alcaloides bisbenziliso-quinolínicos. 3. Cromatografia. 4. Atividade antitumoral. 5. Atividade antimicrobiana. I. Oliveira, Eduardo de Jesus. II. Título. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 615

Ficha Catalográfica – Sistema de Bibliotecas/UFVJM

Bibliotecária: Viviane Pedrosa – CRB6/2641



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

MALU PEREIRA RIBEIRO

ATIVIDADE ANTITUMORAL E ANTIMICROBIANA DE ALCALOIDES BISBENZILISOQUINOLÍNICOS
DE *Cissampelos sympodialis* Eichler (Menispermaceae)

Dissertação apresentada ao
MESTRADO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS, nível de MESTRADO
como parte dos requisitos para
Obtenção do título de MESTRA EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Orientador (a): Prof. Dr. Eduardo De Jesus Oliveira

Data da aprovação : 28/08/2020

Prof.Dr. EDUARDO DE JESUS OLIVEIRA - UFVJM

Prof.Dr.ª CRISTIANE FERNANDA FUZER GRAEL - UFVJM

Prof.Dr.ª ANA PAULA RODRIGUES - UFVJM

DIAMATINA

2020



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo de Jesus Oliveira, Servidor**, em 01/12/2020, às 10:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cristiane Fernanda Fuzer Grael, Servidor**, em 01/12/2020, às 11:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Paula Rodrigues, Servidor**, em 01/12/2020, às 15:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufvjm.edu.br/sei/controlador_externo.php?](https://sei.ufvjm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufvjm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0230839** e o código CRC **B0414961**.

*“O observador da natureza vê, com admiração, que o mundo inteiro
está cheio da glória de Deus.”*

Carl Linnaeus

“Seja a mudança que você quer ver no mundo.”

Mahatma Gandhi

***Dedico essa conquista a Deus, minha mãe, Nena
e minha madrinha e segunda mãe, Naninha.***

AGRADECIMENTOS

Glória maior ao meu Pai, que nunca me desamparou. Deus único, que a todo tempo foi minha inesgotável fonte de força e paciência.

Aos meus pais, Nena e Luiz, pelo incentivo e esforços diários em função da realização dos meus sonhos.

A minha irmã Luane, por todo amor e carinho, pela sua alegria e espontaneidade que me motivou tantos dias.

A minha irmã e filha, Luísa, por me mostrar, através da sua pureza e infinito afeto, que pequenas coisas podem ter grande importância. Por me fazer sentir o mais lindo e limpo amor.

A toda a minha família, em especial aos meus avós, Zélia e Zeca, minha madrinha e segunda mãe, Naninha, meu tio Elson e minhas tias Dinha e Zilma, pelas orações, por toda ajuda, pela torcida e por serem tão constantes.

Aos meus amigos, especialmente Maricota, Sandra, Nanda, Chris, Jô, Greyci, Mayra, Apoenna, Valdenízia, Alécia e Kaio por terem sido meu chão e minha distração, e principalmente por não me deixarem desanimar em nenhum momento.

As minhas amigas e companheiras de estrada, Kariny e Suzane, pelo nosso divã, por tantos risos, lágrimas, almoços e cafés. Por serem minha alegria depois que nos permitimos aventurar tanto para aprender.

As minhas colegas de república, Leonara e Giovana, por serem família e colo todo esse tempo, por terem me permitido, verdadeiramente, entrar na casa de vocês.

Aos colegas da Prefeitura de Lontra por confiarem no meu trabalho, por me darem todo tempo que precisei. E aos colegas da Prefeitura de Montes Claros, especialmente Clodine, por serem tanto em tão pouco tempo, por me darem tanto espaço, pelo consolo e risos diários.

Ao meu orientador Dr. Eduardo Oliveira, por me direcionar e transmitir tanto do seu conhecimento, pela paciência e, principalmente, por não ter desistido de mim.

Aos colegas do DeFar, especialmente Carina, Thaís, Jéssica, Aventino, Kelly, Álvaro e Sandro, pelo apoio de todos os dias, por terem sido fonte de aprendizado a todo instante, e por serem luzes no meu caminho.

E a UFVJM, por ter sido meu sonho e minha realidade, por ser minha casa e por ter financiado esse período de dedicação.

RESUMO

Cissampelos sympodialis (Menispermaceae) é uma espécie popularmente conhecida como “milona”, utilizada na medicina popular, especialmente para afecções do trato respiratório. Apesar de inúmeras ações dos extratos e de alcaloides bisbenzilisquinolínicos desta espécie já terem sido relatados, estes ainda não haviam sido testados de forma sistemática para atividade antitumoral ou antimicrobiana. Assim, o objetivo deste estudo foi realizar uma revisão sistemática das atividades antitumoral e antimicrobiana de alcaloides bisbenzilisquinolínicos e testar os alcaloides isolados frente às atividades mencionadas. Para isso, a fração de alcaloides dos rizomas foi preparada e subfracionada utilizando cromatografia líquida preparativa. Os alcaloides isolados (warifteína e metilwarifteína) foram caracterizados por técnicas espectrométricas. Ensaio de atividade antitumoral foram realizados em linhagens HepG2, de tumor hepático, e HCT116, de tumor de cólon. A atividade antimicrobiana foi testada frente a várias espécies bacterianas gram positivas e gram negativas. A revisão sistemática identificou 38 estudos relativos à atividade antitumoral, envolvendo 31 alcaloides bisbenzilisquinolínicos diferentes. Os resultados mais promissores envolvem a ação da tetrandrina em câncer de colo uterino, cólon, e mama, com $CI_{50} < 2 \mu M$. Com relação à atividade antibacteriana e antifúngica, um número bem menor de artigos foi identificado, envolvendo nove alcaloides, e 18 espécies bacterianas, sendo *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Staphylococcus aureus* aquelas com mais cepas testadas com maior número de ABBI diferentes. Foram identificados trabalhos com seis espécies fúngicas, sendo a *C. albicans* a única testada com dois ABBI diferentes, e demais espécies apenas com um ABBI. A subfração de alcaloides de *C. sympodialis* codificada como P04 (ainda não identificada) apresentou resultado promissor frente à linhagem HCT116, com $CI_{50} 23,68 \mu g/mL$, porém nenhuma das frações triadas nesse estudo apresentou resultado promissor para a linhagem HepG2. A warifteína foi efetiva contra três espécies bacterianas, *E. coli*, *S. agalactiae* e *K. oxytoca*, na concentração de $200 \mu M$.

Palavras-chave: *Cissampelos sympodialis*; alcaloides bisbenzilisquinolínicos; cromatografia; atividade antitumoral; atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Cissampelos sympodialis (Menispermaceae) is a species popularly known as “milona”, and is used in traditional medicine specially for respiratory tract diseases. Despite the reported pharmacological actions of extracts and isolated bisbenzylisoquinoline alkaloids from the species, these were not tested in a systematic way for their antitumor or antimicrobial effects. Thus, the aim of this work was to perform a systematic review of the literature for the antitumor and antimicrobial activity of bisbenzylisoquinoline alkaloids and to test the isolated alkaloids from the species for these biological activities. The total alkaloid fraction from the rhizomes was prepared and fractionated using preparative high-performance liquid chromatography. The isolated alkaloids (warifteine and methylwarifteine) were characterized by spectrometric techniques. Antitumor assays were performed using the following cell lines: HepG2, from liver tumor and HCT116, from colon tumor. The antimicrobial activity was tested against several gram-positive and gram-negative bacteria. The systematic review of the literature identified 38 studies regarding antitumor activity of bisbenzylisoquinoline alkaloids, involving 31 different alkaloids. The most promising studies for antitumor effect are those of tetrandrine against uterine, colon and breast cancer, with $IC_{50} < 2 \mu M$. As for antibacterial and antifungal activity, the number of studies was considerably lower, involving nine alkaloids and 18 bacterial strains, with *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Staphylococcus aureus* the species with more strains tested and with a larger number of different alkaloids tested. We identified studies involving six types of fungi, and *C. albicans* was the only one tested with more than one alkaloid, while the other fungi types were tested against only one substance. The *Cissampelos sympodialis* alkaloid subfraction coded as P04 (not yet identified) showed activity against HCT116 tumor cell line, with $IC_{50} 23.68 \mu g/mL$, however none of the fractions or isolated alkaloids were active against the HepG2 cell line. Warifteine was effective against three bacterial strains, *E. coli*, *S. agalactiae* e *K. oxytoca*, at $200 \mu M$.

Keywords: *Cissampelos sympodialis*; bisbenzylisoquinoline alkaloids; chromatography; antitumor activity; antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Fotos dos frutos e folhas de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl., no horto do Centro de Biotecnologia (UFPB)	27
Figura 02. Esqueleto benziltetrahidrosoquinolínico	28
Figura 03. Diagrama ilustrativo da metodologia de semeadura da placa	41
Figura 04. Fotografia ilustrando a semeadura real da Placa para <i>Klebsiella oxytoca</i> e <i>Escherichia coli</i>	41
Figura 05. Fotografia ilustrando a semeadura real da Placa para <i>Streptococcus agalactiae</i>	41
Figura 06. Fluxograma PRISMA para Atividade Antitumoral	44
Figura 07. Fluxograma PRISMA para Atividade Antibacteriana	45
Figura 08. Fluxograma PRISMA para Atividade Antifúngica	46
Figura 09. Cromatograma representativo da separação por CLAE preparativa da FATT rz	49
Figura 10. Amostras dissolvidas em solvente orgânico, após eluição através de extração em fase sólida	50
Figura 11. Material concentrado e seco	50
Figura 12. Estrutura química dos alcaloides caracterizados: warifteína (A) e metilwarifteína (B)	52
Figura 13. Cromatograma obtido pela técnica de cromatografia a líquido de ultra eficiência (UPLC) das Frações 5 (A) e 6 (B)	53
Figura 14. Espectro de massas de alta resolução por electrospray (modo positivo), obtido pela técnica de cromatografia a líquido de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS) para as frações 5 e 6. A e C são espectros obtidos com baixa energia de colisão e B e D espectros obtidos com alta energia de colisão	55
Figura 15. Mecanismo de fragmentação proposto para a warifteína e metilwarifteína com perda de radical <i>p</i> -xilil (104 uma)	56
Figura 16. Cromatograma referente ao pico 6 previamente isolado por CLAE- prep.	56

Figura 17. Esqueletos dos subtipos de alcaloides benzilisoquinolínicos: (a) benzilisoquinolina_(a), (b) benziltetrahidroisoquinolina e (c) dehidrotetrahidroisoquinolina57

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Distribuição da massa entre os picos cromatográficos.

Tabela 02. Comparação dos deslocamentos químicos de RMN de ^1H das Fracções 5 e 6 com os dados de referência para warifteina e metilwarifteina, respectivamente.

Tabela 03. Estudos de ABBI com atividade antitumoral.

Tabela 04. Triagem da atividade antitumoral.

Tabela 05. Estudos de ABBI com atividade antibacteriana.

Tabela 06. Espécies bacterianas triadas.

Tabela 07. Estudos de ABBI com atividade antifúngica.

LISTA DE QUADROS

Quadro 01. Estruturas Químicas dos ABBI referenciados na revisão sistemática.

Quadro 02. Classificação estrutural dos ABBI citados na revisão sistemática.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01. Resultado do ensaio de citotoxicidade de war contra *C. albicans*.

Gráfico 02. Resultado do ensaio de citotoxicidade de war contra *C. parapsilosis*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5637 – Linhagem de tumor de bexiga

70S6 – Ribosomal protein S6 kinase beta-1

786-O – Linhagem de tumor renal

A2780 – Linhagem de tumor de ovário

A-498 – Linhagem de tumor renal

A549 – Linhagem de tumor de pulmão

ABBI – Alcaloide (s) bisbenzilisquinolínico (s)

ACHN – Linhagem celular de tumor renal

ADAM17 – Disintegrin and metalloproteinase 17 (desintegrina e metalloproteinase domínio 17)

AIF – Apoptosis-inducing fator (Fator de indução de apoptose)

Akt – AKT Serine/Threonine Kinase 1

AMPK – AMP-activated protein kinase (Proteína quinase ativada por AMP (monofosfato de adenosina))

AR – Artigo de revisão

ATCC – American Type Culture Collection ()

ATCC 11778 – Linhagem celular da espécie *Bacillus cereus*

ATCC 14028 – Linhagem celular da espécie *Salmonella typhimurium*

ATCC 22019 – Linhagem celular da espécie *Candida paraosilosis*

ATCC 25922 – Linhagem celular da espécie *Escherichia coli*

ATCC 25931 – Linhagem celular da espécie *Proteus mirabilis*

ATCC 27853 – Linhagem celular da espécie *Pseudomonas aeruginosa*

ATCC 29313 – Linhagem celular da espécie *Streptococcus agalactiae*

ATCC 49131 – Linhagem celular da espécie *Klebsiella oxytoca*

ATCC 6623 – Linhagem celular da espécie *Bacillus subtilis*

ATCC 90028 – Linhagem celular da espécie *Candida albicans*

ATCC15442 – Linhagem celular da espécie *Pseudomonas aeruginosa*

ATF-6 α – Activating Transcription Factor 6 α

ATF-6 β – Activating Transcription Factor 6 β

Atg12 – Autophagy related 12

Atg5 – Autophagy related 5

Atg7 – Autophagy related 7

AVO – Acidic Vesicular Organelle (Organela vesicular ácida)

Baf – Barrier-to-autointegration factor (Fator de barreira para autointegração)

Bak – Bcl – associated killer (Bcl associada a killer)

Bax – BCL-2 associated protein X (Bcl associada a proteína X)

Bcl-2 – B-cell lymphoma 2 (Linfoma de células B 2)

Bcl-xL – B-cell lymphoma-extra large (linfoma de células B extra grande)

BEL7402 – Linhagem de tumor hepático

bFGF – Basic fibroblast growth factor (fator de crescimento de fibroblasto básico)

BHI - Brain heart infusion (infusão de cérebro e coração)

BI - Benzilisoquinolina

Bid – BH3 interacting domain death agonist (Agonista de morte de domínio de interação de BH3)

c-(FLIP) L – Proteína inibidora de FLICE celular

CAB – Com atividade biológica

Caki-1 – Linhagem de tumor renal

Caspase-3 – Cysteine-aspartic acid protease 3

Caspase-6 – Cysteine-aspartic acid protease 6

Caspase-7 – Cysteine-aspartic acid protease 7

Caspase-8 – Cysteine-aspartic acid protease 8

Caspase-9 – Cysteine-aspartic acid protease 9

CCK- 8 – Cell Counting Kit-8

CI 50 – Concentração Inibitória 50%

CIM – Concentração inibitória mínima

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CLAE-prep – Cromatografia líquida de alta eficiência preparativa

CLSI – Clinical e Laboratory Standards Institute (Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais)

CT-26 – Linhagem de tumor de cólon

$\Delta\Psi_m$ - Potencial de membrana mitocondrial

DAPI – 4'-6-diamidino-2-phenylindole (4'-6-diamidino-2-fenilindol)

DE 50 – Dose efetiva para 50%

DeFar - Departamento de Farmácia

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DU145 – Linhagem de tumor de próstata

ECA – Linhagem de tumor de EHRLICH

EEBrz - Extrato etanólico bruto dos rizomas de *Cissampelos sympodialis*

EEtOH - Extrato etanólico de *Cissampelos sympodialis*

EF – Estudo farmacocinético

EFR – Extrato ou fração

EFS – Extração em fase sólida

EJ – Linhagem de tumor de bexiga

Endo-G – Endonuclease G

ERO – Espécie reativa de oxigênio

ESI - ionização por eletronebulização

FAT00RZ - Fração total de alcaloides

FATT-rz – Fração de alcaloides terciários totais dos rizomas de *Cissampelos sympodialis*

Fiocruz BA – Fundação Osvaldo Cruz - Bahia

FURA-2/AM – Fura-2-acetoxymethyl ester (Fura-2 – acetoximetil éster)

G0 – Fase Gap 0 do ciclo celular

G1 – Fase Gap 1 do ciclo celular

G2 – Fase Gap 2 do ciclo celular

GADD153 – Growth arrest- and DNA damage-inducible gene 153 (parada de crescimento e gene 153 induzível por dano ao DNA)

GRP78 – 78-kDa glucose-regulated protein (Proteína regulada por glicose de 78 kDa)

H - HORA

H37Ra - Cepa MDR-MTB

H37Ra - ETA - R - Cepa MDR-MTB

H37Ra - PZA - R - Cepa MDR-MTB

H37Ra -PAS - R - Cepa MDR-MTB

H441 – Linhagem de tumor de pulmão

H460 – Linhagem de tumor de pulmão

H520 – Linhagem de tumor de pulmão

H661 – Linhagem de tumor de pulmão

Hb – Hemoglobina

HCT116 – Linhagem de carcinoma de cólon humano

HeLa – Linhagem de tumor de colo uterino

HeLa - S3 – Linhagem de tumor de colo uterino

Hep3B – Linhagem de tumor hepático

HepG2 – Linhagem de carcinoma hepatocelular humano

HSC-3 – Linhagem de tumor oral

Huh7 – Linhagem de tumor hepático

ICD – Isolamento, caracterização e determinação estrutural

J82 – Linhagem de tumor de bexiga

JNK – c-Jun N-terminal kinase (proteína C-Jun J terminal quinase)

KB - LINHAGEM DE TUMOR DE NASOFARINGE

LC 50 – Dose letal 50%

LC/MS - Cromatografia líquida acoplada a espectometria de massas

LC3 - I – Light chain 3 -I (PROTEINA DE CADEIA LEVE TIPO 3 -I)

LC3 - II – Light chain 3 -I (PROTEINA DE CADEIA LEVE TIPO 3 -II)

LnCap – Linhagem de tumor de próstata

M – Fase mitótica do ciclo celular

MAPK – Mitogen-Activated Protein Kinase

MCF-7 – Linhagem de tumor de mama

Mcl1 – Myeloid cell leukemia 1 (Célula mieólide de leucemia 1)

MDA-MB-231 – Linhagem de tumor de mama

MDA-MB-436 – Linhagem de tumor de mama

MDA-MB-468 – Linhagem de tumor de mama

MDC – Monodansilcadaverina

MDR-MTB – *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente

MG – Miligrama

μM – Micromolar

μL – Microlitro

μg – Micrograma

mL – Microlitro

MG63 – Linhagem de osteosarcoma

min – Minuto

MOPS – morfolinopropanosulfônico

MRC-5 – Linhagem de fibroblasto de pulmão humano

MRSA – Cepa da espécie *Staphylococcus aureus*

MS – Espectometria de massas

MSE – Modo de aquisição de espectometria de massas

MTT – {Brometo de [3-(4,5-dimetilitiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]}

NCI-H460 – Linhagem de tumor de pulmão

NE – Não efetivo

NPC-TW 076 – Linhagem de tumor de nasofaringe

O1(NB2) – Cepa da espécie *Vibrio cholerae*

°C – Graus Centígrados

ODC – Ornithine decarboxylase (Ornitina descarboxilase)

OFF – Otimização de forma farmacêutica

OI - Outro idioma

P02 – Pico cromatográfico 02

P03 – Pico cromatográfico 03

P04 – Pico cromatográfico 04

P05 – Pico cromatográfico 05

P06 – Pico cromatográfico 06

p21 – Proteína 21

p27 – Proteína 27

p38 – Proteína 38

p65 – Proteína 65

p-70S6 – Phospho Ribosomal protein S6 kinase beta-1

p-AKT – Phosphorylated Akt (AKT fosforilada)

PANC-1 – Linhagem de tumor de pâncreas

PARP – Poli ADP-ribose polimerase

PBMC – Peripheral Blood Mononuclear Cells

PBS – Phosphate-buffered saline (Tampão fosfato salina)

PC-3 – Linhagem de tumor de próstata

PCNA – Antígeno Nuclear de Proliferação Celular

p-EGFR – Phosphorylated epidermal growth factor receptor (Receptor de fator de crescimento epidérmico fosforilado)

pGSK – Phosphorylated glycogen synthase kinase (proteína glicogênio sintase quinase fosforilada)

pH - Potencial hidrogeniônico

p-mTOR – Phosphorylated mammalian target of rapamycin (Alvo fosforilado da rapamicina em mamíferos)

pPI3K – Phospho-PI3 kinase (Fosfo – PI3 - quinase)

PRISMA – Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses (principais itens para relatar revisões sistemáticas e meta-análises)

p-s6 – Phospho-S6 Ribosomal Protein (Proteína ribossomal fosfo S-6)

p-ULK1 – Phosphorylated Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1 ()

Puma – p53 up-regulated modulator of apoptosis (modulador de apoptose regulado positivamente por p53)

Raptor – Regulatory-associated Protein of mTOR (Proteína associada a regulação de m-TOR)

RMN – Ressonância magnética nuclear

RMN de ¹H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RPMI – Instituto Roswell Park Memorial

RT-2 – Linhagem de glioma

RT-PCR – Reverse-transcriptase polymerase chain reaction (Reação em

cadeia de polimerase reversa)

S – Fase de síntese do ciclo celular

S. agalactiae – *Streptococcus agalactiae*

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

Sub-G1 – Fase Sub Gap 1 do ciclo celular

B. subtilis – *Bacillus subtilis*

SVOV3 – Linhagem de tumor de ovário

SW480 – Linhagem de tumor de cólon

SWO-38 – Linhagem de glioma

T24 – Linhagem de tumor de bexiga

TPA – Tissue polypeptide antigen (Antígeno de polipeptídeo de tecido)

TUNEL – TdT-mediated dUTP-TMR Nick End Labeling

U - 251 – Linhagem de glioma

U - 87 – Linhagem de glioma

Uacc-257 – Linhagem de tumor de pele

UFC – Unidade formadora de colônia

UFPB – Universidade Federal da Paraíba

UFVJM - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

ULK1 – Unc-51 like autophagy activating kinase 1

UMA - UNIDADE DE MASSA ATÔMICA

UPLC - Cromatografia líquida de ultra performance

UV - ultravioleta

VEGF – Vascular endothelial growth fator (fator de crescimento endotelial vascular)

V-EGFP – documento pdf

VT3 – Cepa da espécie *Escherichia coli*

WAR – Warifteína

YPD – Yeast extract – Peptone – Dextrose (Extrato de Levedura – Peptona e Dextrose)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	26
2.	OBJETIVOS	30
2.1.	Objetivo Geral: Isolar os alcaloides bisbenzilisquinolínicos majoritários de <i>Cissampelos sympodialis</i> , e avaliar sua atividade antimicrobiana e antitumoral.....	30
2.2.	Objetivos Específicos:	30
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1.	Solventes, substâncias e reagentes.....	31
3.2.	Obtenção dos alcaloides bisbenzilisquinolínicos dos rizomas de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl.	31
3.2.1.	Coleta dos rizomas de <i>Cissampelos sympodialis</i> e identificação taxonômica do material vegetal	31
3.2.2.	Obtenção do extrato hidroalcólico bruto dos rizomas da planta . 31	
3.2.3.	Marcha sistemática para isolamento de alcaloides de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl	32
3.2.4.	Isolamento de alcaloides bisbenzilisquinolínicos de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Preparativa (CLAE-prep).....	33
3.2.5.	Concentração em Fase Sólida.....	33
3.2.6.	Análise das amostras coletadas do isolamento CLAE-prep	34
3.2.7.	Repurificação das amostras analisadas	34
3.2.8.	Caracterização das amostras – RMN ¹ H	35
3.2.9.	Análise LC/MS	35
3.3.	Ensaio de Citotoxicidade em Linhagens de Células Tumerais <i>in vitro</i> 36	
3.3.1.	Preparo das amostras	36
3.3.2.	Células.....	37
3.3.3.	Ensaio de Citotoxicidade	37
3.4.	Triagem de Atividade Antibacteriana e Antifúngica	38
3.4.1.	Cultivo de Células.....	38
3.4.2.	Preparação da solução de warifteína	40
3.4.3.	Semeadura da placa.....	40
3.4.4.	Ensaio de eficácia de atividade antimicrobiana	42
3.5.	Análise Estatística	42
3.6.	Revisão Sistemática.....	43
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4.1.	Obtenção da Fração de Alcaloides Terciários Totais (FATTrz).....	48

4.2.	Separação da FATTTrz por CLAE-prep	48
4.3.	Concentração em Fase Sólida	49
4.4.	Secagem das Amostras	50
4.5.	Identificação dos Alcaloides	51
4.6.	Revisão Sistemática de Atividade Antitumoral de Alcaloides Bisbenzilisoquinolínicos	56
4.7.	Triagem de Atividade Antitumoral	97
4.8.	Triagem de Atividade Antibacteriana.....	100
5.	CONCLUSÕES	111
6.	REFERÊNCIAS	112
	ANEXOS	121

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais historicamente sempre desempenharam um papel de destaque no desenvolvimento de novos medicamentos. Fármacos como a morfina, o ácido acetilsalicílico, a penicilina e os contraceptivos orais foram resultado do estudo dos produtos naturais oriundos de plantas e de micro-organismos. Com o avanço da química farmacêutica e dos métodos de síntese orgânica, os produtos naturais perderam espaço nos programas de desenvolvimento de medicamentos das grandes indústrias farmacêuticas. Porém, estudos recentes (NEWMAN; CRAGG., 2020) mostram que ainda hoje os produtos naturais desempenham um papel central no desenvolvimento de novos medicamentos, com 64,8% dos medicamentos antitumorais aprovados entre 1940 e 2019 sendo medicamentos não sintéticos. Destes, 53,3% (oitenta e cinco fármacos) são produtos naturais ou moléculas diretamente derivadas deles. A área de antimicrobianos também é muito dependente dos produtos naturais, especialmente aqueles isolados de culturas bacterianas (NEWMAN; CRAGG., 2020).

O Brasil ostenta uma vasta diversidade de espécies vegetais, distribuídas entre todas as regiões, sendo assim apresenta um enorme potencial para o desenvolvimento de medicamentos que tenham como ponto de partida moléculas de origem natural. (COSTA-LOTUFO; MONTENEGRO; ALVES; MADEIRA *et al.*, 2010)

Cissampelos sympodialis Eichl é uma angiosperma eudicotiledônea, representante da família Menispermaceae, endêmica no Brasil, presente nas regiões nordeste e sudeste, desde o estado de Ceará até o estado de Minas Gerais, com ocorrência em áreas de semi-árido principalmente, conhecida popularmente como “milona”, “jarrinha”, “orelha de onça” e “abuteira”. Possui seu habitat em áreas abertas de solo argiloso, mede de 80 – 100 cm de comprimento, com frutos de coloração vermelho alaranjado quando maduros (Figura 01) e medindo cerca de 1,0 – 1,5 cm de diâmetro. Suas folhas e rizomas são utilizados na medicina popular para o tratamento de doenças do trato respiratório, reumatismo e artrite (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO,

2007; BARBOSA FILHO; AGRA; THOMAS, 1997; DE FREITAS; DE ALENCAR; DA-CUNHA; BARBOSA-FILHO *et al.*, 1995; EICHLER; 1887; THOMAS; BURNS; PYNE; PYNE, 1997).



Figura 01. Fotos dos frutos e folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl., no horto do Centro de Biotecnologia (UFPB).

A composição química de *C. sympodialis*, assim como de toda a família Menispermaceae, é marcada pela presença de alcaloides, em que se destacam a milonina (DE FREITAS; DE ALENCAR; DA-CUNHA; BARBOSA-FILHO *et al.*, 1995), a warifteína (CORTES; DEALENCAR; THOMAS; BARBOSA, 1995), a metilwarifteína (BARBOSA FILHO; AGRA; THOMAS, 1997), a laurifolina (ALENCAR, 1994), a liriodenina e a roraimina (DE LIRA; DE ANDRADE; FLORENCIO; DA SILVA *et al.*, 2002), sendo a warifteína o mais abundante (CAVALCANTI; GOMES; PORTO; AGRA *et al.*, 2014).

Os alcaloides com maior representatividade em *C. sympodialis* são do tipo bisbenzilisquinolínico (Figura 02), que, por sua vez, derivam-se do esqueleto benziltetrahidroisoquinolínico (MELO; CAVALCANTE; BARBOSA-FILHO; DINIZ *et al.*, 2003). Existe a associação desse tipo de alcaloide a diversas atividades biológicas, dentre elas: inibição de histamina (ALVES; VIEIRA; GADELHA; CAVALCANTE-SILVA *et al.*, 2017); atividade vasorrelaxante (CAVALCANTE; RIBEIRO; SILVA; NUNES *et al.*, 2011), ação espasmolítica (DE FREITAS; CORTES; BARBOSA FILHO, 1996), atividade antiinflamatória (DE LIRA; DE ANDRADE; FLORENCIO; DA SILVA *et al.*, 2002)

e atividade citotóxica (MELO; CAVALCANTE; BARBOSA-FILHO; DINIZ *et al.*, 2003).

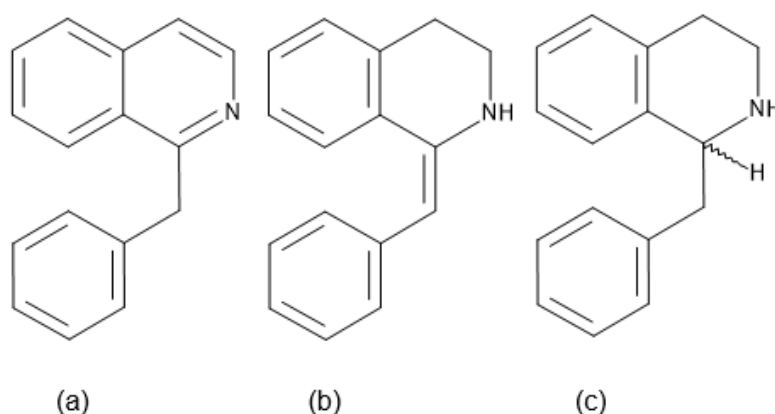


Figura 02. Esqueletos Benziltetrahydroisoquinolínicos. Esqueletos dos Subtipos de Benzilisquinolina: (a) benzilisquinolina, (b) benziltetrahydroisoquinolina e (c) dehidrotetrahydroisoquinolina.

A atividade antitumoral de alcaloides bisbenzilisoquinolínicos já foi relacionada a diversas substâncias, como por exemplo, a tetrandrina, que se mostrou ativa contra diversos tipos de tumores, como: glioma (CHEN, Y.; CHEN, J.-C.; TSENG, S.-H., 2009), (CHEN; TSENG, 2010; JIN; YANG; DAI; KHAN *et al.*, 2018), sarcoma 180 (KURODA; NAKAZAWA; KATAGIRI; SHIRATORI *et al.*, 1976), tumor de bexiga (KOU; LIU; XU; YANG *et al.*, 2017), tumor hepatocelular (GONG, K.; CHEN, C.; ZHAN, Y.; CHEN, Y. *et al.*, 2012; LIU; ZHANG; CHEN; QI *et al.*, 2010) (YOO, S.-M.; OH, S.-H.; LEE, S.-J.; LEE, B.-W. *et al.*, 2002) e de cólon (HE; GAO; ZHANG; LUO *et al.*, 2011a; WU; CHEN; CHEN; LIN *et al.*, 2010). Outros alcaloides bisbenzilisoquinolínicos (ABBI), como fangchinolina, possui atividade relatada contra tumores de próstata (LI; XIANG; TANG, 2015), a 7-hidroxi-hidronuciferina, que também apresentou interessante atividade antitumoral contra linhagens de câncer de próstata, gástrico e de pele (LIU; KAO; WU; LI *et al.*, 2014), cicleanina contra tumor de ovário (UCHE; DRIJFHOUT; MCCULLAGH; RICHARDSON *et al.*, 2016), e a neferina contra adenocarcinoma (KALAI SELVI; VINOTH; VARADHARAJAN; WENG *et al.*, 2017).

Câncer é o termo genérico para uma variedade de doenças com a característica em comum de crescimento anormal e desordenado de células que podem invadir outras partes do corpo, como tecidos e órgãos. Esta doença

é a segunda maior causa de morte mundial, e os números aumentam a cada ano. Em 2005, 7,6 milhões de pessoas morreram de câncer, já em 2018 é estimado que tenha causado 9,6 milhões de mortes, podendo atingir 22,2 milhões de novos casos até 2030 (INCA, 2019).

Mais de 70% dos casos de câncer concentram-se em países de baixa e média renda, uma vez que nestes estão muitas vezes comprometidas as medidas de prevenção ou diagnóstico precoce, sendo de 30 a 50% dos casos evitáveis. Não somente os casos aumentam, como o impacto na economia mundial também. Estima-se que o custo anual em 2010 tenha sido de US\$ 1.16 trilhões de dólares (WHO, 2012).

Sendo um problema de saúde pública mundial, a busca de drogas eficazes, seguras e efetivas é contínua.

Outro problema de grande preocupação no meio médico-científico é a resistência microbiana às drogas (CHIPINGA; KAMANULA; MOYO, 2018). O uso descontrolado de antimicrobianos gerou o surgimento de microrganismos resistentes a múltiplas drogas, uma vez que os mesmos acabaram por se adaptar aos mecanismos dos medicamentos disponíveis (ROCHA; REYNOLDS; SIMONS, 2015).

Além da resistência, o surgimento de novas doenças causadas por microrganismos é um fator bastante relevante na justificativa pela busca de novos medicamentos.

Vários alcaloides já foram testados quanto à atividade antibacteriana e antifúngica, para os tipos mais variados de microrganismos. Entretanto, os alcaloides bisbenzilisoquinolínicos ainda foram pouco explorados nesse sentido. Em função da disseminação de microrganismos resistentes, é crescente e relevante a busca de novas substâncias com o objetivo de conter infecções na comunidade e no âmbito hospitalar.

Existem diversos trabalhos publicados que relacionam alcaloides bisbenzilisoquinolínicos à atividade antitumoral, sendo bem mais escassos os trabalhos sobre atividade antibacteriana e antifúngica. Entretanto, a quantidade de estudos clínicos que possam levar estes alcaloides ou seus derivados ao uso terapêutico ainda é bastante escassa. Dessa forma, a realização do estudo justifica-se pela necessidade de encontrar alternativas terapêuticas para tais problemas relatados, a fim de ampliar as possibilidades de tratamento.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral: Isolar os alcaloides bisbenzilisquinolínicos majoritários de *Cissampelos sympodialis*, e avaliar sua atividade antimicrobiana e antitumoral.

2.2. Objetivos Específicos:

- Realizar uma revisão sistemática das atividades antitumoral e antimicrobiana de alcaloides bisbenzilisquinolínicos.
- Isolar através de CLAE preparativa os principais alcaloides da fração de alcaloides terciários de *C. sympodialis*.
- Caracterizar os constituintes isolados mais abundantes.
- Realizar triagem de atividade antitumoral dos alcaloides isolados de *C. sympodialis*.
- Realizar triagem de atividade antimicrobiana de warifteína.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Solventes, substâncias e reagentes

Para realização da marcha de isolamento de alcaloides a partir de *Cissampelos sympodialis* Eichl foram utilizados como solventes: etanol 96° (Toscano); 0 etanol absoluto (Merck); água destilada; água purificada (Direct-Q® 5UV); ácido clorídrico (Merck), hidróxido de amônio, (Merck); clorofórmio, (Vetec); metanol grau HPLC (JTBaker); sulfato de sódio anidro, - (Merck).

3.2. Obtenção dos alcaloides bisbenzilisoquinolínicos dos rizomas de *Cissampelos sympodialis* Eichl.

3.2.1. Coleta dos rizomas de *Cissampelos sympodialis* e identificação taxonômica do material vegetal

Os rizomas de *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae) utilizados neste trabalho foram coletados no horto das dependências do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), em João Pessoa, em maio de 2015. A parte da planta a ser utilizada foi escolhida em função da maior concentração dos metabólitos desejados estarem nela contidos (BARBOSA FILHO; AGRA; THOMAS, 1997). A identificação botânica foi realizada pela botânica Prof. Dra. Maria de Fátima Agra (UFPB) e uma exsicata está depositada no herbário Lauro Pires Xavier da UFPB com o código Agra 1456. O cadastro de acesso ao patrimônio genético junto ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado para este trabalho tem certidão de número A3016A6, obtido em 01/11/2018.

3.2.2. Obtenção do extrato hidroalcólico bruto dos rizomas da planta

Os rizomas de *C. sympodialis* foram secos em estufa com ar circulante a 40 °C e triturados. Em seguida, submeteu-se o pó seco (1668 g) a uma série de macerações sucessivas, com um intervalo de 72 h entre cada uma das macerações, perfazendo um total de dez macerações. O solvente de extração utilizado foi o etanol 70% com adição de hidróxido de amônio para

alcalinização do meio, procedendo-se a primeira extração adicionando-se inicialmente o hidróxido de amônio (cerca de 250 mL) ao pó seco, passando-se 24 h para então adicionar o etanol (1750 mL). Aguardou-se por mais 48 h para retirada do líquido extrator. Esse processo foi repetido por nove vezes, até que o resultado do teste de Dragendorff fosse negativo. Uma última extração foi realizada procedendo-se a agitação da massa do material vegetal juntamente com o líquido extrator em sonicador (Ultra Cleaner® 1400), por um período de 30 minutos, porém esse procedimento não contribuiu para melhora do processo extrativo, visto não ter ocorrido alteração na coloração do líquido extraído ou alteração no resultado do teste de Dragendorff. Dessa forma, considerou-se finalizada a etapa de obtenção do extrato hidroalcólico (EEtOH) de *C. sympodialis*. A solução do EEtOH obtida foi evaporada a pressão reduzida em rotaevaporador (Fisatom, 801) a 60 °C resultando em um extrato etanólico bruto dos rizomas (EEBrz) concentrado de coloração castanha (111,1 g, 6,7% m/m em relação ao peso dos rizomas secos), odor levemente adocicado e consistência de uma massa firme. O mesmo foi submetido a uma marcha para isolamento da fração de alcaloides terciários totais dos rizomas (FATT-rz).

3.2.3. Marcha sistemática para isolamento de alcaloides de *Cissampelos sympodialis* Eichl

O isolamento da FATT-rz de *C. sympodialis* a partir do EEBrz (111,1 g) consistiu em adicionar à massa do mesmo, uma solução de ácido clorídrico a 3% (400 mL) sob agitação mecânica até a obtenção de faixa de pH 2,0-3,0. Seguiu-se a filtração da solução ácida em funil de Buchner com celite, a qual foi submetida a várias extrações com clorofórmio (cerca de 100 mL a cada extração) em funil de separação, por cinco vezes, objetivando remover principalmente as graxas e outras impurezas apolares. A fase clorofórmica foi reservada. Com a fase aquosa ácida, realizou-se a alcalinização da mesma com hidróxido de amônio sob agitação mecânica (agitador mecânico IKA T25 digital ultra Turrax®) até obtenção de pH 9,0, quando se procedeu com a extração exaustiva com clorofórmio em funil de separação até que a reação para alcaloides com reagente de Dragendorff não mais fosse positiva para a fase orgânica assim obtida. Descartou-se a fase aquosa básica e realizou-se a

lavagem da fase clorofórmica com água, secando-se com sulfato de sódio anidro e, em seguida, filtrou-se e evaporou-se a mesma em evaporador rotatório sob pressão reduzida a 60 °C, obtendo-se, assim, a FATT-rz de *C. sympodialis* (15,84 g, 14,26 % em relação ao peso do EEBrz).

3.2.4. Isolamento de alcaloides bisbenzilisoquinolínicos de *Cissampelos sympodialis* Eichl por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Preparativa (CLAE-prep)

Para isolar os alcaloides bisbenzilisoquinolínicos, foram realizadas análises cromatográficas em equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Preparativo com as seguintes especificações: CBM-20A Prominence Communications Bus Module UFLC Shimadzu, DGU-20A5 Prominence Degasser Shimadzu®, bombas LC-6AD, SPD-M20A Prominence Detector de arranjo de fotodiodos Shimadzu®, Forno de coluna CTO-20A Prominence

Shimadzu, utilizando uma coluna preparativa de fase reversa PREP-ODS(H)KIT C18, (250 x 20 mm D, Shim-pack®). As condições cromatográficas consistiram no gradiente de 0-7 min (65 % B), 8-15 min (70% B), 16-28 min (80% B) de fase móvel composta por água (A) e metanol (B), ambos alcalinizados com solução de hidróxido de amônio até pH 8,0; comprimento de onda de detecção de 278 nm; fluxo de 12,0 mL/min e o tempo total de corrida de 28 minutos. O isolamento foi realizado injetando-se 2 mL da FATT-rz de *C. sympodialis*, na concentração de 10 mg/mL, preparada em uma mistura de metanol e água na proporção de 65:35 (v/v). As subfrações foram coletadas separadamente, cada uma correspondendo a um pico cromatográfico (registrado no cromatograma) resultante da cromatografia preparativa da FATT-rz.

3.2.5. Concentração em Fase Sólida

O solvente das subfrações coletadas através de CLAE-prep foi removido usando um método de extração em fase sólida (EFS), com cartuchos de SPE Supelclean (1 g/6 mL da Supelco, Sigma-Aldrich, Brazil). Antes da aplicação da amostra, os cartuchos foram condicionados com 20 mL de metanol (4x5 mL), seguido de 20 mL de água (4x5mL), usando para isso uma

estação de extração à vácuo (vacuum manifold, Supelco, Sigma-Aldrich, Brazil). Cada subfração coletada foi previamente diluída com água até a concentração de metanol ter sido reduzida a 10% (v/v) ou menos de forma a prevenir a eluição prematura dos alcaloides (sample breakthrough). Após a aplicação das amostras os cartuchos foram então purgados até estarem secos através da aplicação do vácuo. Finalmente, as amostras foram eluídas em frascos Falcon usando 4x5 mL de metanol. As amostras foram transferidas para balão de fundo redondo e o metanol foi evaporado até secura usando um evaporador rotatório sob pressão reduzida.

3.2.6. Análise das amostras coletadas do isolamento CLAE-prep

Para analisar a pureza das seis amostras coletadas por meio da CLAE-prep, foi realizada cromatografia analítica no mesmo equipamento da etapa anterior, utilizando uma coluna analítica de fase reversa da marca PHENOMENEX® (CL Coluna Luna 5 μ M C18, 250 x 4,5 mm). As condições cromatográficas consistiram em eluição por gradiente: 0-7 min (65 %), 8-15 min (70%), 16-28 min (80%) de fase móvel de metanol e água (ambos basificados, pH 8,0); detecção por UV em 278 nm; fluxo de 1,0 mL/min e o tempo total de corrida de 28 minutos. A análise foi realizada a partir da injeção de 20 μ L de cada uma das seis amostras em uma diluição de 1:10 em metanol e água (65:35) a partir da concentração estoque de 2 mg/mL.

3.2.7. Repurificação das amostras analisadas

Para repurificação, quando necessária, foram utilizadas corridas no mesmo equipamento CLAE, utilizando uma coluna semi-preparativa de fase reversa da marca PHENOMENEX® (Coluna Luna 5 μ C18, 250x10 mm). As condições cromatográficas para a repurificação consistiram em eluição por gradiente: 0-10 min (65% B), 10-12 min (70% B), 12-28 min (80% B) de fase móvel composta água (A) e metanol (B) ajustados até pH 8,0; detecção por UV em 278 nm; fluxo de 5,0 mL/min e o tempo total de corrida de 28 minutos. A análise foi realizada a partir da injeção de 1 mL das amostras (5 mg/mL) que não se apresentaram puras.

3.2.8. Caracterização das amostras – RMN ^1H

Os alcaloides referentes aos picos cromatográficos 5 e 6 foram caracterizados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e por espectrometria de massas de alta resolução. Os espectros de RMN foram adquiridos em um espectrômetro Bruker Avance 400 MHz operado a 300 K. As amostras foram dissolvidas em CDCl_3 com 0.5% CD_3OD (volume final ~ 0.6 ml). Os deslocamentos químicos foram expressos em δ (ppm) e internamente referenciados ao sinal residual de CHCl_3 . Os dados foram obtidos no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises da Universidade Federal da Paraíba, em João Pessoa, com a colaboração do Prof. Dr Vicente Carlos de Oliveira Costa.

3.2.9. Análise LC/MS

As amostras das frações 5 e 6 foram caracterizadas também através de UPLC-QTOF-MS (cromatografia a líquido de ultra performance (UPLC) acoplada a espectrometria de massas (MS) do tipo quadrupolo-tempo de voo). As análises foram realizadas no Laboratório de Bioprospecção Fitoquímica, do Departamento de Química da Universidade Federal Rural de Pernambuco com a colaboração da Profa Dra Tânia Maria Sarmiento Silva. O espectrômetro XEVO-G2XSQTOF (Waters, Manchester, UK) foi conectado ao sistema de UPLC ACQUITY UPLC (Waters, Milford, MA, USA) através de uma interface de ionização por eletronebulização (ESI). A separação cromatográfica das substâncias foi realizada no ACQUITY UPLC com um amostrador automático condicionado a uma temperatura de 4 °C e utilizando para separação uma coluna Waters ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 \times 50 mm, 1.7 μm) (Waters, Milford, MA, USA). A fase móvel, que consistiu de uma mistura de água com 0,1% de ácido fórmico em água (solvente A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (solvente B) foi bombeada a um fluxo de 0,4 mL min^{-1} . A eluição em modo gradiente foi a seguinte: 0-5 min, 5-10% B; 5 -9 min, 10-95% B. O volume de injeção foi de 5-10 μL . A análise por espectrometria de massas de alta resolução foi realizada em um espectrômetro Xevo G2 QTOF (Waters MS Technologies, Manchester, UK), que consiste de um espectrômetro do tipo quadrupolo-tempo de voo em tandem acoplado a uma fonte de íons por

eletronebulização operada no modo positivo. A faixa de varredura foi configurada para m/z 50 a 1200 para aquisição de dados. Além disso, experimentos do tipo MSE, em que dados de íons precursor e íons produto são obtidos de forma simultânea em uma única análise foram também realizados. As condições da fonte de íons foram: voltagem do capilar de 3 kV; temperatura da fonte de 120 °C, temperatura de dessolvatação de 450 °C, fluxo do gás do cone de amostragem de 50 L.h⁻¹, fluxo do gás de dessolvatação (N₂) de 800 L.h⁻¹ e voltagem do cone de 40V. Todas as análises foram realizadas utilizando-se para calibração da escala de massa o Lockspray[®], que garantiu a exatidão e reprodutibilidade das análises. Uma solução de calibração de Leucina-encefalina (200 pg.mL⁻¹) foi usada como padrão para calibração. A aquisição de dados foi feita usando o software Waters MassLynx v. 4.1.

3.3. Ensaio de Citotoxicidade em Linhagens de Células Tumorais *in vitro*

Os ensaios de citotoxicidade em linhagens de células tumorais *in vitro* foram realizados pelo Dr. Daniel Pereira Bezerra, Dra. Milena Botelho Pereira Soares, Ms. Valdenízia Rodrigues Silva e Luciano de Souza Santos, pesquisadores da Universidade Federal da Bahia em colaboração com esta universidade.

Foram testadas seis amostras, sendo: a fração total de alcaloides, os constituintes químicos representados nos cromatogramas pelos picos 2, 3, 4, 5 e 6, identificadas como FAT00RZ, P02, P03, P04, P05 e P06, respectivamente. Não foi possível realizar os testes com o material correspondente ao pico cromatográfico 1, já que a quantidade do mesmo não correspondia a mínima necessária para tal feito.

3.3.1. Preparo das amostras

As amostras foram diluídas em DMSO puro estéril na concentração de 5mg/mL (para compostos puros). As amostras foram testadas em concentrações que variaram de 0,19-25 µg/mL.

3.3.2. Células

Foram utilizadas células HCT116 (carcinoma de colón humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano) obtidas da ATCC. As células foram cultivadas em garrafas para cultura de células (75 cm³, volume de 250 mL), os meios utilizados foram RPMI 1640 e suplementados com 10% de soro fetal bovino. As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5 % de CO₂ a 37 °C. Diariamente acompanhava-se o crescimento celular com a utilização de microscópio de inversão. O meio foi trocado sempre que o crescimento celular atingia confluência necessária para renovação de nutrientes. Para a manutenção de células aderidas utilizou-se tripsina (0,25%) para que as células despregassem-se das paredes das garrafas. As culturas de células apresentavam negativas para micoplasma, conforme avaliado pela coloração com corante Hoechst (Mycoplasma Stain Kit, Cat. MYC1, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA).

3.3.3. Ensaio de Citotoxicidade

Para avaliar a citotoxicidade das substâncias, o ensaio do Alamar blue foi realizado após 72 horas de exposição com as substâncias teste. O alamar blue, identificado como resazurina (O'BRIEN; WILSON; ORTON; POGNAN, 2000), é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox. Como com os sais de tetrazólio, o alamar blue reduz-se em células em proliferação. A forma oxidada é azul (não fluorescente/célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/célula viável). A redução do alamar blue reflete a proliferação celular. Este foi inicialmente utilizado para indicar crescimento e/ou viabilidade celular no monitoramento de proliferação de linfócitos (AHMED; GOGAL; WALSH, 1994) e atualmente apresenta várias aplicações.

Inicialmente, as células foram plaqueadas em placas de 96 cavidades (100 µL/poço de uma solução de $0,3 \times 10^6$ células/mL para células em suspensão e $0,7 \times 10^5$ células/mL para células aderidas). Após 24 horas de incubação, as substâncias testes dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionadas em cada poço e incubadas por 72 horas. A doxorrubicina foi

utilizada como controle positivo. O controle negativo recebeu a mesma quantidade de DMSO. Quatro horas (vinte e quatro horas para as células monocucleares do sangue periférico - PBMC) antes do final do período de incubação, 20 µL da solução estoque (0,312 mg/mL) de alamar blue (resazurina) foram adicionados a cada poço. As absorbâncias foram mensuradas nos comprimentos de onda de 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado) utilizando uma leitora de placa (AHMED; GOGAL; WALSH, 1994). A porcentagem de inibição foi calculada e registrada a porcentagem de inibição x log da concentração e determinado os valores de CI_{50} (concentração inibitória média) a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

3.4. Triagem de Atividade Antibacteriana e Antifúngica

3.4.1. Cultivo de Células

As espécies selecionadas para teste incluíram microrganismos de características variadas, sendo bacteriana: *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella oxytoca* (ATCC 49131), *Pseudomonas aeruginos* (ATCC 27853), *Proteus mirabili* (ATCC 25931), *Streptococcus agalactiae* (ATCC 29313), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), e fúngica: *Candida albicans* (ATCC 90028) e *Candida parapsilosis* (ATCC®22019) preservadas em freezer no Departamento de Farmácia da UFVJM.

Todas as espécies bacterianas foram subcultivadas em meio BHI (Prodimol Biotecnologia, Brasil) acrescentado de 2% de ágar ágar (Vetec®, Brasil) diluído em água destilada (UFVJM, Brasil), autoclavada e posteriormente adicionada em placa de Petri, por 24 horas em temperatura de 37°C em estufa. Para obtenção da suspensão bacteriana e realização dos ensaios, foram retiradas de duas a três colônias de bactéria de uma cultura de 24 horas em meio BHI sólido (Prodimol Biotecnologia, Brasil) que foram ressuspensas em solução salina 0,09% estéril, até atingir turvação igual à suspensão correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland. A concentração foi também confirmada por meio da leitura espectrofotométrica em espectrofotômetro (Biospectro®) a 625 nm, onde a faixa de absorbância

deve estar entre 0,08 a 0,1, em que a suspensão deve conter aproximadamente de $1,2 \times 10^8$ UFC/mL. Na sequência, 1 mL dessa suspensão foi diluída em 9 mL de Caldo Muller Hinton (Himedia®, Índia) obtendo uma suspensão de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL, que foi a utilizada nos ensaios, sendo distribuídos 50 µL/poço em placas de 96 poços (Sarstedt®) juntamente com 50 µL da solução de warifteína (Pico 5) nas diferentes concentrações testadas. Tudo foi realizado conforme a metodologia descrita na norma M7-A6 do Manual CLSI (INSTITUTE, 2015).

Foram utilizados os seguintes controles: de esterilidade do meio (caldo Muller Hinton sem suspensão bacteriana), do solvente (caldo Muller Hinton com 0,125% de DMSO na presença da suspensão bacteriana); controle da solução de warifteína (sem suspensão bacteriana), controle de viabilidade (meio Muller Hinton na presença de suspensão bacteriana) e controle positivo ou fármaco padrão (Clorafenicol a 30 µg/mL). Foram realizadas triplicatas dos experimentos e das concentrações da solução da warifteína e dos controles testados.

Foi utilizado o meio RPMI tamponado com MOPS por 48 horas, mantidos em temperatura de 37°C. 50 µL das células foram semeadas em placas de 96 poços.

Para a determinação da concentração inibitória mínima sobre células fúngicas leveduriformes, foi utilizado o método de microdiluição em placa, com modificações, de acordo com as normas do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), documento M27-A2 para leveduras (INSTITUTE, 2015).

A suspensão para realização dos ensaios foi obtida por meio da retirada de duas a três colônias de leveduras de uma cultura de 48 horas em meio sólido YPD cuja formulação consistiu em 1% de extrato de levedura (Himedia, Índia), 2% de peptona (Himedia, Índia), 2% de Glicose (Isofar, Brasil) e 2% de ágar (Vetec®, Brasil) por 48 horas, em temperatura de 37°C em estufa. Para o ensaio, as cepas foram ressuspendidas em solução salina 0,9% estéril, até atingir turvação igual à suspensão correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland. Em seguida, a concentração foi confirmada por meio da leitura espectrofotométrica em espectrofotômetro (Biospectro®) a 530 nm, onde a faixa de transmitância deve estar entre 0,25 a 0,30. Esse procedimento forneceu uma suspensão de levedura contendo cerca de 1×10^6 a 5×10^6 células/

mL. Posteriormente, essa suspensão foi diluída na proporção de 1:20 com meio RPMI tamponado com MOPS, resultando em uma suspensão na concentração de $5,0 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$ células/mL por 48 horas, mantidos em temperatura de 37°C.

Para os ensaios foram utilizados placas de 96 poços (Sarstedt®) e em cada poço foram adicionados 50 µL do inóculo da suspensão de microorganismo e 50 µL das diferentes concentrações de warifteína. Foram utilizados os seguintes controles: de esterilidade do meio (meio RPMI tamponado com Mops), do solvente (RPMI tamponado com Mops com 0,125% de DMSO e suspensão fúngica), controle dos extratos nas concentrações testadas (sem suspensão fúngica), controle de viabilidade (meio RPMI tamponado com Mops) e controle positivo ou fármaco padrão (anfotericina B a 4µg/mL). Foram realizadas triplicatas dos experimentos e das concentrações dos extratos e dos controles testados.

3.4.2. Preparação da solução de warifteína

A warifteína previamente isolada (caracterizada a partir do pico 5 da FATT-rz) foi diluída em DMSO estéril, na concentração 10 mg/ml (concentração mãe) que foi posteriormente diluída, no momento do ensaio, em meio de cultivo com concentração inicial de 400 µM, com diluição limitante na semeadura até a concentração final de 3,125 µM.

3.4.3. Semeadura da placa

As placas foram semeadas utilizando: 1. cepas das espécies (50 µL), 2. solução controle de cada espécie em meio de cultura, 3. controle DMSO, 4. controle antibiótico e antifúngico de referência, Clorafenicol e Anfotericina B, respectivamente, e 5. meio de cultura puro, acrescentados na solução de Warifteína, em que foi realizada diluição limitante, seguindo então as concentrações: 400 µM, 200 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM e 3,125 µM, conforme apresentado na Figura 03 (ilustrativo) e Figura 04 e 05 (real).

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	[War]	Espécie 1			Espécie 2			Espécie 3			Controles		
A	400 μ M	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	200 μ M	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	100 μ M	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	50 μ M	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	25 μ M	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	12,5 μ M	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	6,25 μ M	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	3,125 μ M	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

	Meio de Cultura + Espécie 1		Clorafenicol + Espécie 1
	Meio de Cultura + Espécie 2		Clorafenicol + Espécie 2
	Meio de Cultura + Espécie 3		Clorafenicol + Espécie 3
	DMSO + Esp1 / DMSO + Es 2 / DMSO + Esp 3 (Um por poço)		Meio de Cultura

Figura 03. Diagrama ilustrativo da metodologia de semeadura da placa

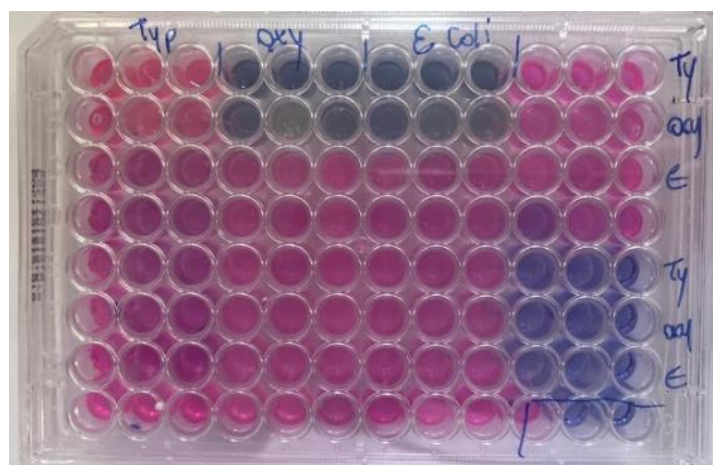


Figura 04. Fotografia ilustrando a semeadura real da Placa para *Klebsiella oxytoca* e *Escherichia coli*.

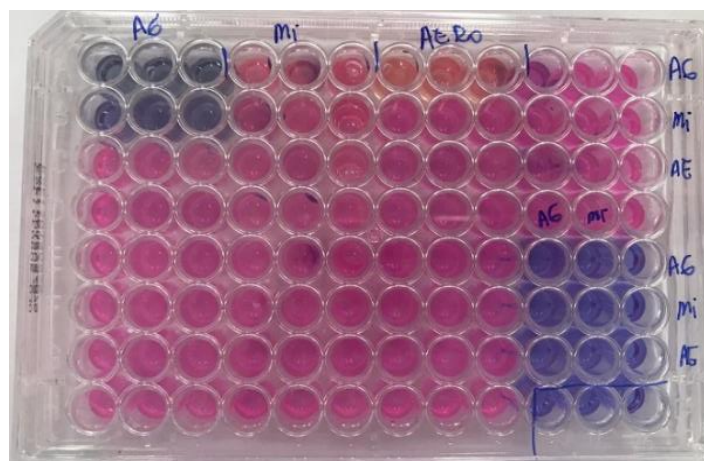


Figura 05. Fotografia ilustrando a semeadura real da placa para *S. agalactiae*.

3.4.4. Ensaio de eficácia de atividade antimicrobiana

Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para as espécies bacterianas, foram acrescentados, após incubação de 24 horas, a cada poço 25 μ L do corante 7-hidroxi-3H-fenoxazina3-ona-10-óxido conhecido como resazurina (Sigma-Aldrich, Alemanha) ou Alamar Blue, na concentração final 0,5 mg/mL, e deixado em repouso por 4 horas em temperatura de 37°C em estufa.

Posteriormente, foi realizada a leitura visual das placas e os extratos que não apresentaram a coloração rosa foram considerados com atividade antibacteriana. A mudança de cor, inicialmente azul para rosa, determinava a presença ou ausência de atividade em cada concentração de War. A coloração azul é indicativo de ausência de crescimento celular, enquanto a observação da coloração rosa, indica a presença de crescimento.

Para as espécies fúngicas, após incubação, adicionou-se em cada poço 20 μ L de solução de MTT (Brometo de 3-(4,3-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) na concentração de 0,5 mg/ml e houve posterior incubação de 4 horas a 37°C. Após esse período, o sobrenadante foi removido e adicionou-se a cada poço, 100 μ L de DMSO (Vetec®) para solubilização dos cristais de formazano. A placa então foi submetida à leitura da absorbância em leitor de microplaca (Molecular Devices®) a 540 nm (MOSMANN, 1983). A técnica do MTT representa um ensaio colorimétrico quantitativo, sensível e de fácil reprodução. Essa técnica baseia-se na atividade de uma enzima mitocondrial específica, a succinato desidrogenase, que reage com o brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), reduzindo-o a um composto colorido (formazano), solúvel em alguns solventes orgânicos como DMSO. Somente células (mitocôndrias) viáveis podem realizar essa conversão, o que faz a quantidade de formazano produzida ser diretamente proporcional à viabilidade celular, podendo ser medida em espectrofotômetro (MOSMANN, 1983).

3.5. Análise Estatística

Os dados obtidos no experimento serão testados quanto à normalidade e comparados utilizando o teste “Shapiro-Wilk”, ONeway ANOVA,

seguido do teste de Tukey's multiple comparisons test, usando o programa GraphPadPrism 5.0. Apenas os valores de $p \leq 0.05$ serão considerados significativos.

3.6. Revisão Sistemática

A revisão sistemática foi realizada segundo orientações do guia: "Principais itens para relatar revisões sistemáticas e meta-análises", PRISMA (acrônimo em Inglês para: "Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses", que consiste em um conjunto mínimo de itens necessários em uma revisão sistemática (MOHER; LIBERATI; TETZLAFF; ALTMAN, 2009). As figuras 06, 07 e 08 detalham a seleção dos artigos, bem como a coleta de dados e os critérios de inclusão e exclusão da revisão, para atividades antitumoral, antibacteriana e antifúngica, respectivamente.

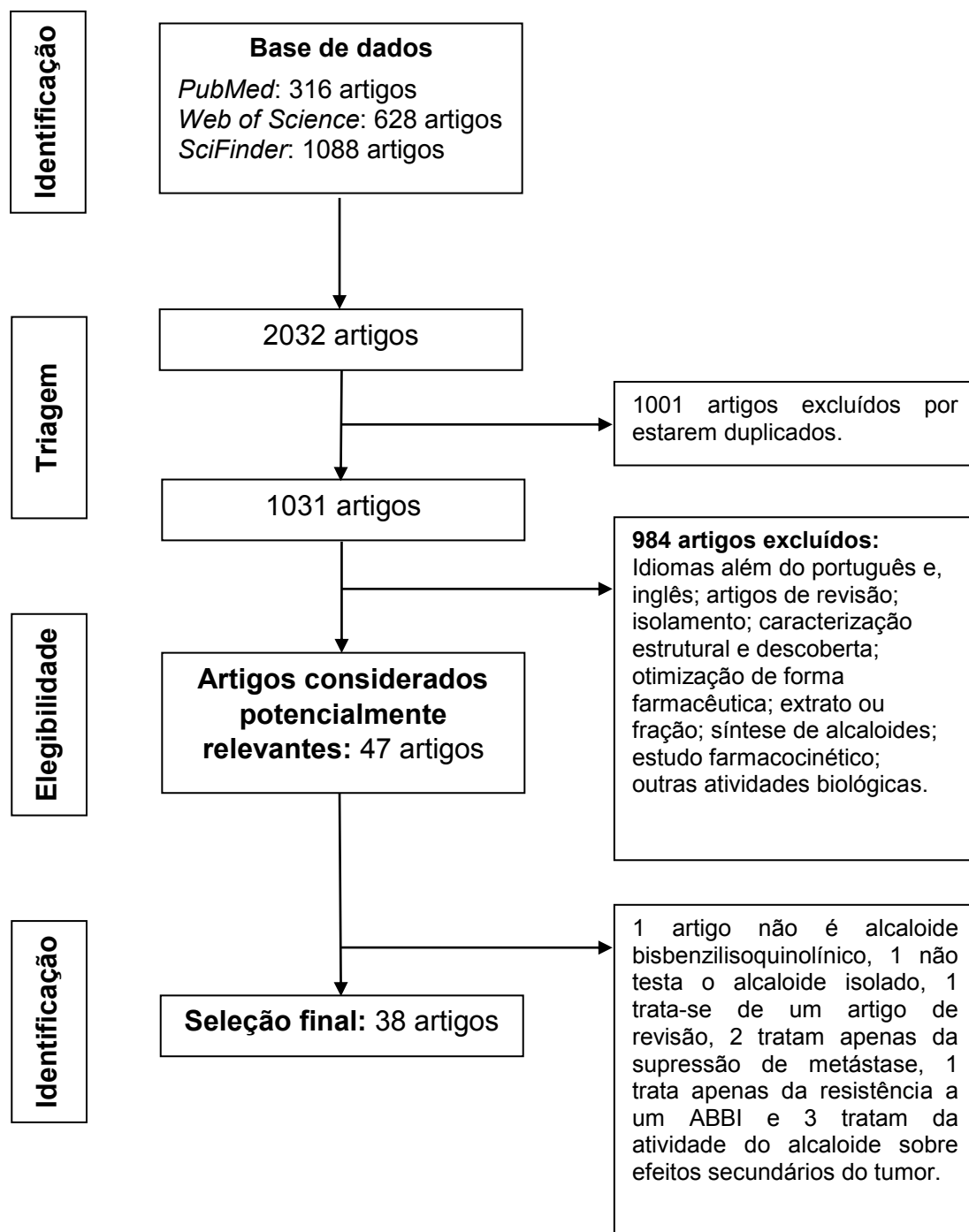


Figura 06. Fluxograma PRISMA para Atividade Antitumoral. Fonte: AUTOR, 2020.

Como bases de dados para busca dos artigos, foram utilizadas as bases “PubMed”, “Web of Science” e “SciFinder (Chemical Abstract Service)”, com consulta realizada em janeiro de 2019 sendo refeita mensalmente, para que fosse atualizado o número de artigos, sendo a última realizada em julho de 2019. Foi utilizado o descritor “bisbenzylisoquinoline alkaloids”, sem limitadores

de data, sendo que os idiomas de publicação considerados foram Português e Inglês, excluindo-se os demais.

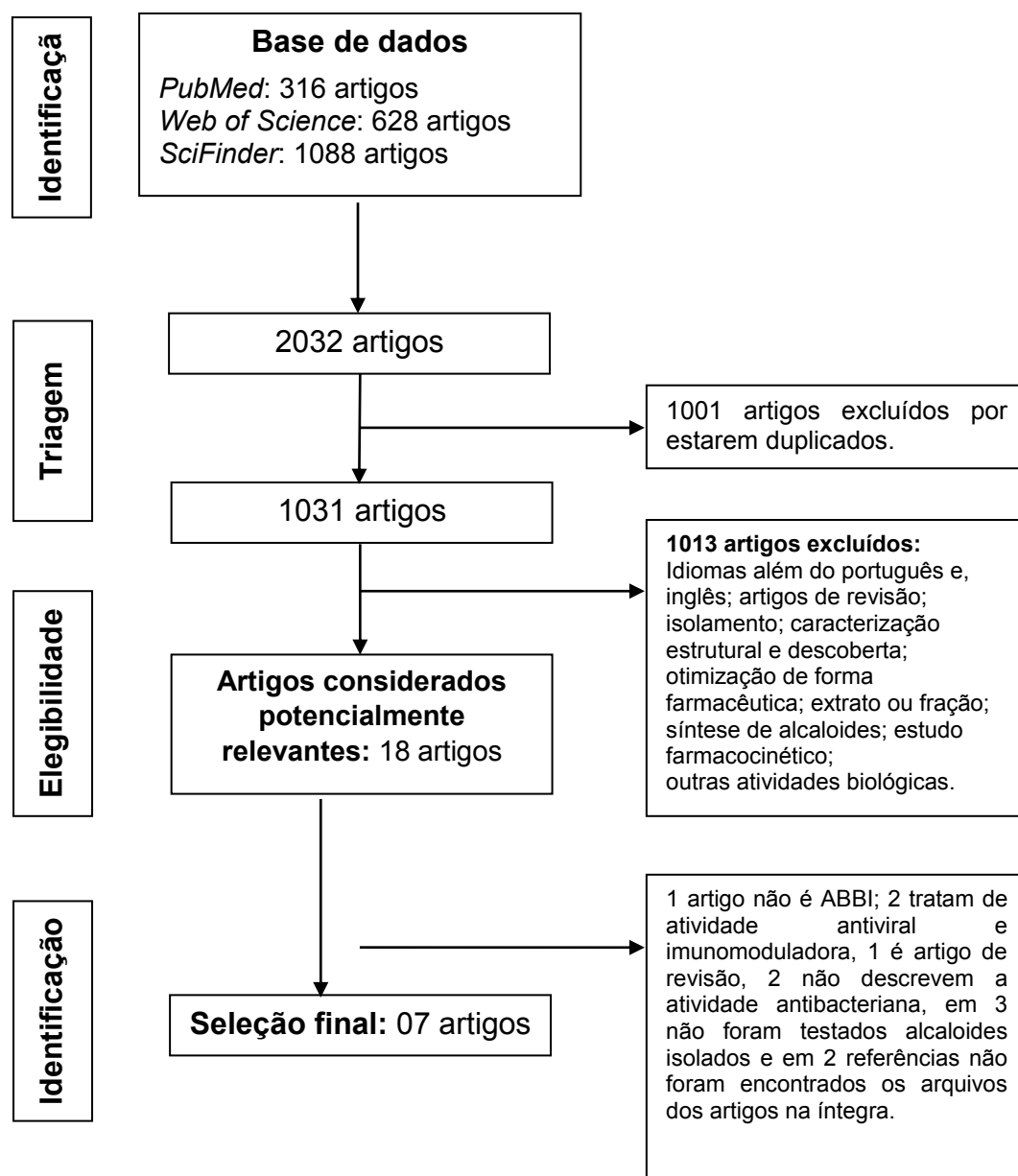


Figura 07. Fluxograma PRISMA para Atividade Antibacteriana. Fonte: AUTOR, 2020.

A seleção dos artigos foi realizada através da leitura crítica do título e resumo e texto na íntegra quando necessário. Foram utilizados dois critérios de inclusão de estudos, sendo o idioma inglês ou português e estudos *in vitro* e *in vivo* de substâncias isoladas. Na ocorrência de divergência quanto a categorização entre os revisores iniciais, foi consultado um terceiro revisor. Os artigos selecionados foram lidos integralmente.

Os artigos foram agrupados em: CAB (com atividade biológica), ICD (artigos que descreviam apenas isolamento, caracterização e determinação estrutural), OFF (artigos relacionados a otimização de forma farmacêutica), AR (artigos de revisão), EF (artigos envolvendo estudo farmacocinético), OI (outro idioma além de inglês, português), síntese de ABBI (síntese de alcaloides bisbenzilisoquinolínicos), EFr (extrato ou fração), e por fim Não é ABBI, onde foram incluídos artigos que ao serem completamente lidos, não apresentava testes com ABBI. Foram incluídos no estudo os artigos que, dentro da categorização CAB, apresentavam estudos sobre a atividade antitumoral, antibacteriana e antifúngica dos ABBI. Os artigos das demais categorias foram excluídos da seleção.

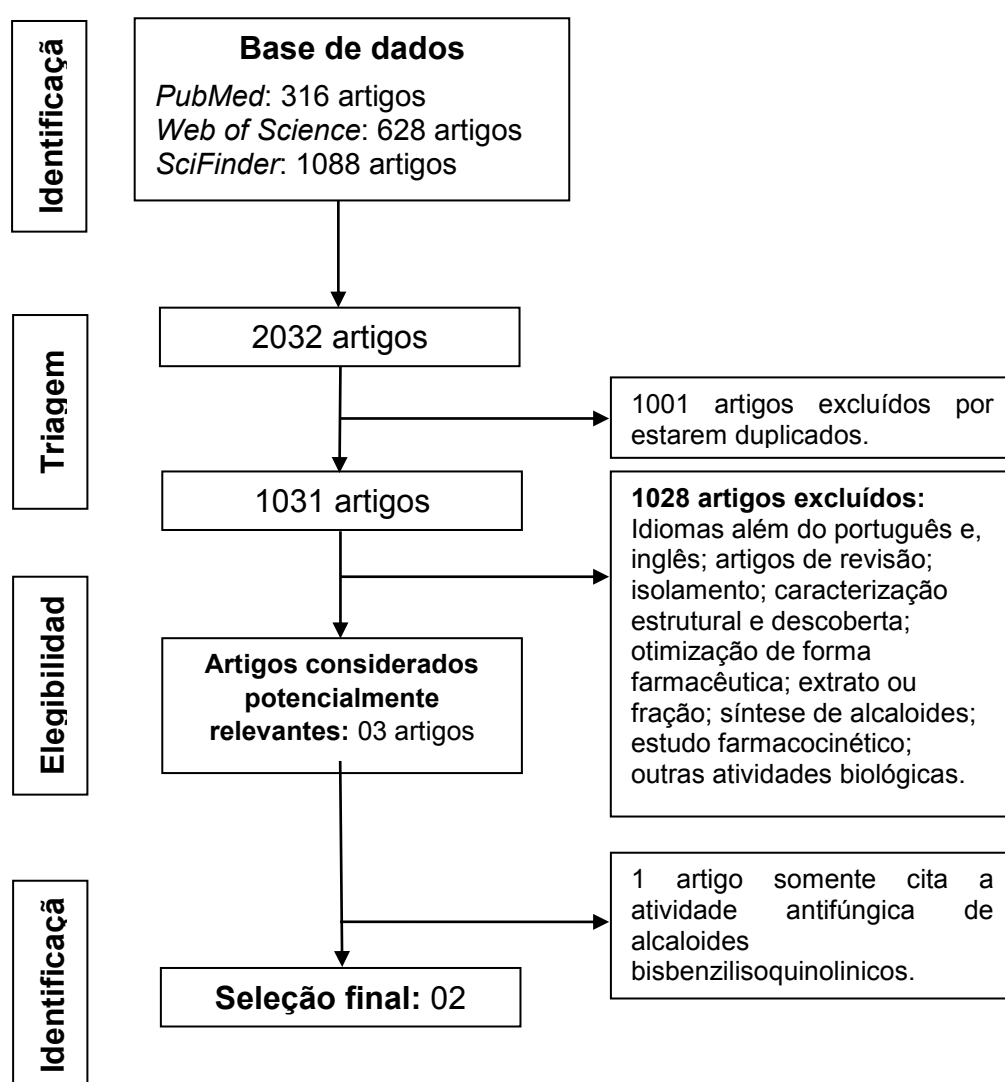


Figura 08. Fluxograma PRISMA para Atividade Antifúngica. Fonte: AUTOR, 2020.

Os dados foram extraídos pela pesquisadora e um segundo revisor. As informações coletadas incluíram referência bibliográfica, nome do alcaloide testado, ensaios e métodos realizados, linhagem celular para os artigos de atividade antitumoral e microrganismo para os artigos de atividade antibacteriana e antifúngica, resultados obtidos e origem do alcaloide testado (espécie vegetal da qual foi extraído ou outra forma de obtenção), que foram organizados em forma de tabelas, por atividade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Obtenção da Fração de Alcaloides Terciários Totais (FATTrz)

Cissampelos sympodialis apresenta-se como uma espécie com grande relevância na descoberta de moléculas bioativas, uma vez que já foram confirmadas diversas atividades biológicas para substâncias dela isoladas, como espasmolítica e efeito citotóxico, atribuídos a warifteína e a milonina (DE FREITAS; DE ALENCAR; DA-CUNHA; BARBOSA-FILHO *et al.*, 1995) (MELO; CAVALCANTE; BARBOSA-FILHO; DINIZ *et al.*, 2003), anti-anafilática (THOMAS; BURNS; PYNE; PYNE, 1997), antidepressiva (ALMEIDA; NAVARRO; DE ASSIS; DE MEDEIROS *et al.*, 1998), antiinflamatória (BATISTA-LIMA; RIBEIRO; BALESTIERI; THOMAS *et al.*, 2001; FALCÃO; LIMA; SANTOS; DANTAS *et al.*, 2005) e antialérgia, associada à warifteína (BEZERRA-SANTOS; VIEIRA-DE-ABREU; BARBOSA-FILHO; BANDEIRA-MELO *et al.*, 2006). Essas características associadas a estudos previamente desenvolvidos por este grupo de pesquisa justificaram a escolha da mesma para a realização de testes com outras atividades biológicas.

Com a preparação do extrato bruto foi possível obter 15,84g de FATTrz, que corresponde a um rendimento de 14,26% do extrato etanólico bruto dos rizomas EEBr-rz, sendo este inferior ao obtido por Medeiros (2013), situação que pode ser justificada pela diferença do período de coleta da planta, uma vez que esse fator influencia diretamente na quantidade dos constituintes ativos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; MEDEIROS, 2013).

4.2. Separação da FATTrz por CLAE-prep

A separação da FATTrz foi realizada através da aplicação da técnica CLAE-prep, com a coleta das subfrações isoladas. A utilização de CLAE-prep permite a separação de compostos em função das diferentes características relacionadas a hidrofobicidade, e, conseqüentemente coeficiente de partição entre fase móvel e fase estacionária.

Foram injetados 2 mL da FATT_{rz} na concentração 10 mg/mL, sendo obtido o perfil cromatográfico com a visualização e coleta do eluente correspondente aos seis picos, conforme apresentado na figura 09.

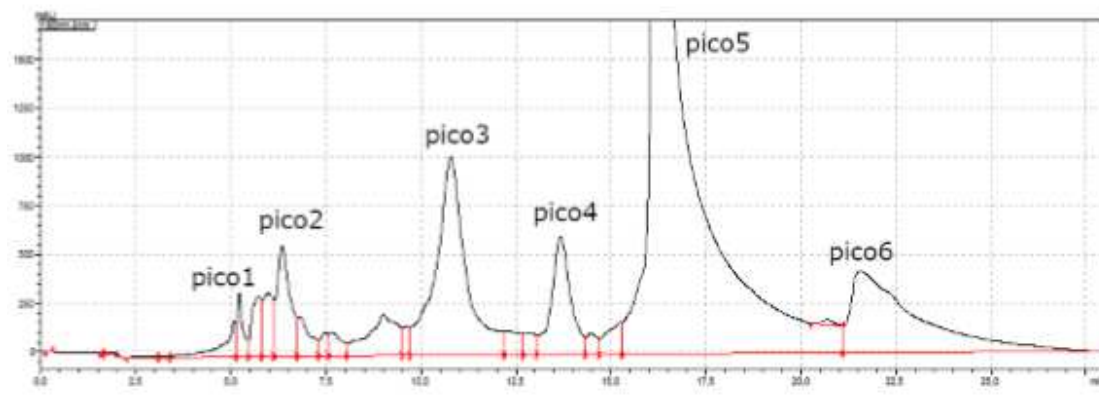


Figura 09. Cromatograma representativo da separação por CLAE preparativa da FATT_{rz}. Condições cromatográficas: C₁₈ (250 x 20 mm); gradiente de 0-7 min (65 %B), 8-15 min (70%B), 16-28 min (80%B) de fase móvel composta por água (A) e metanol (B) (pH 8,0); detecção em 278 nm; fluxo de 12,0 mL/min.

4.3. Concentração em Fase Sólida

A extração em fase sólida (EFS) consiste numa técnica cujas aplicações experimentais ocorrem a mais de cinco décadas, sendo uma alternativa para a extração líquido-líquido, com vantagens na obtenção de analitos em amostras biológicas, tais como a redução do uso de solventes e, consequentemente, redução à exposição aos mesmos, redução de custos e tempo de extração, além de ser um método prático e com boa sensibilidade (HENNION, 1999; QUEIROZ; COLLINS; JADIM, 2001).

A extração é realizada em três etapas que compreendem o condicionamento, cujo objetivo é ativar o material adsorvente com solvente adequado, aplicação da amostra no cartucho e eluição e coleta do analito (LINGEMAN; HOEKSTRA-OUSSOREN, 1997), em que pode ser utilizada, por exemplo, uma estação de vácuo para promover o fluxo do solvente, conforme realizado neste estudo.



Figura 10. Amostras dissolvidas em solvente orgânico, após eluição através de extração em fase sólida.

A Figura 10 apresenta as amostras após a eluição por EFS, sendo possível obter desta forma os analitos dissolvidos em solvente orgânico, eliminando assim a água das frações coletadas, o que otimiza a secagem em evaporador rotatório sob pressão reduzida.

4.4. Secagem das Amostras

Após a obtenção das amostras concentradas e dissolvidas em solvente orgânico, as mesmas foram secas através de rotaevaporador (Figura 11), transferidas para tubos tipo Eppendorff® e deixadas em um dessecador a vácuo para posterior análise.



Figura 11. Material concentrado e seco.

Foram realizadas ao todo 112 injeções da FATTTrz, com 20 mg da amostra introduzidas na coluna cromatográfica a cada injeção, sendo que os constituintes químicos representados pelos picos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 no cromatograma foram coletados e secos. A massa total das subfrações secas e recuperadas foi de 899,3 mg, rendimento equivalente a 40,14%, distribuída conforme tabela 01.

Tabela 01: Distribuição da massa entre os constituintes químicos representados pelos picos cromatográficos. Foi considerado: P01: pico 1, P02: pico 2, P03: pico 3, P04: pico 4, P05: pico 5 e P06: pico 6.

Amostra	Massa
P01	22,8 mg
P02	75 mg
P03	98,5 mg
P04	76,5 mg
P05	547,2 mg
P06	79,6 mg
Total	899,3 mg

4.5. Identificação dos Alcaloides

Identificamos apenas os alcaloides presentes nas frações mais abundantes, uma vez que a massa das amostras para caracterização estrutural e para os ensaios era limitada. A análise cromatográfica por CLAE analítica da Fração 5 resultou em um cromatograma contendo um único (Figura 13 A). Por comparação dos dados de espectroscopia de RMN de ^1H (Tabela 02) e espectros de massa de alta resolução (Figuras 14 A e 14 B) da fração 5 com dados de referência publicados (MUKHERJEE; KEIFER, 2003a) a fração foi identificada como warifteína (Figura 12 A), o principal alcaloide bisbenzilisoquinolínico presente nos rizomas de *C. sympodialis*. A fração 6 também forneceu um pico único quando examinada por CLAE analítica (Figura 16) e identificada como metilwarifteína por comparação de dados de RMN de ^1H (Tabela 02) e espectros de massa de alta resolução (Figura 14 B e 14C) com dados da literatura. No entanto, a análise da Fração 6 usando cromatografia líquida de ultra performance (Figura 13B) e análise por espectrometria de massa em tempo de voo de alta resolução (UPLC-QTOF-

MSE) revelou que era de fato uma mistura de warifteína e metilwarifteína (na proporção de 87,5% de metilwarifteína a 12,5 % warifteína com base na área do pico por cromatografia líquida de ultra performance com detector de arranjo de diodos (Figura 13B). Devido à baixa massa da amostra, a fracção 6 foi utilizada nos ensaios sem purificação adicional. O espectro de massas de electrospray positivo com baixa energia de colisão da warifteína (Figura 14 A e B) revela um íon pai $[M+H]^+$ com $m/z = 593,2640$ amu (calculado para $C_{36}H_{37}N_2O_6 = 593,2646$, erro -1,01 ppm). O espectro de massa de energia de alta colisão (Figura 14) mostra um íon produto com $m/z = 489.2010$ correspondente à perda de um fragmento com 104 uma que pode ser atribuído à perda de uma unidade *p*-xilil (Figura XX), como é geralmente relatado para a Warifteína (AGUIRRE-GALVIS, 1988). A metilwarifteína mostrou um íon precursor $[M + H]^+$ com $m/z = 607.2805$ amu (calculado para $C_{37}H_{39}N_2O_6 = 607.2802$, erro 0,49 ppm). O fragmento com $m/z = 503,2165$ gerado pela perda de 104 amu corresponde à perda de a porção *p*-xilil de um modo semelhante ao observado para a warifteína (Figura XX).

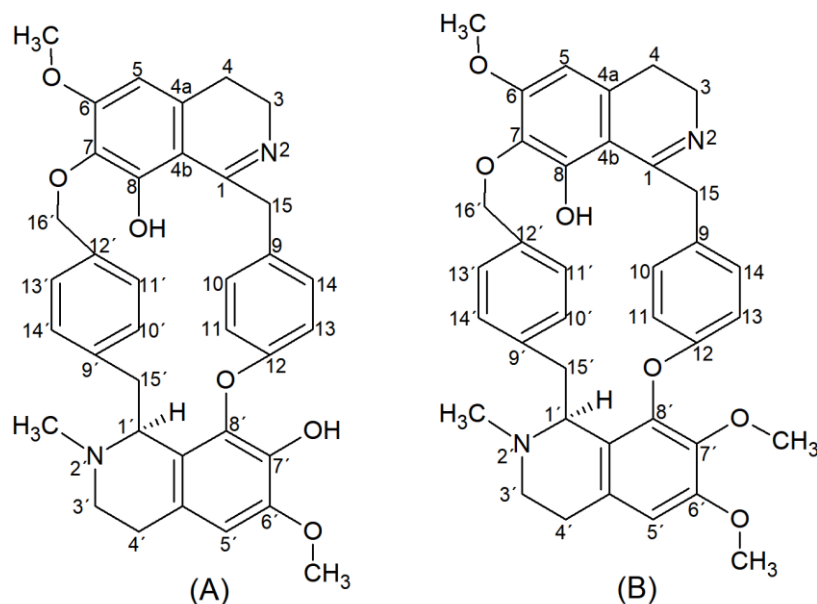


Figura 12. Estrutura química dos alcaloides caracterizados: warifteína (A) e metilwarifteína (B)

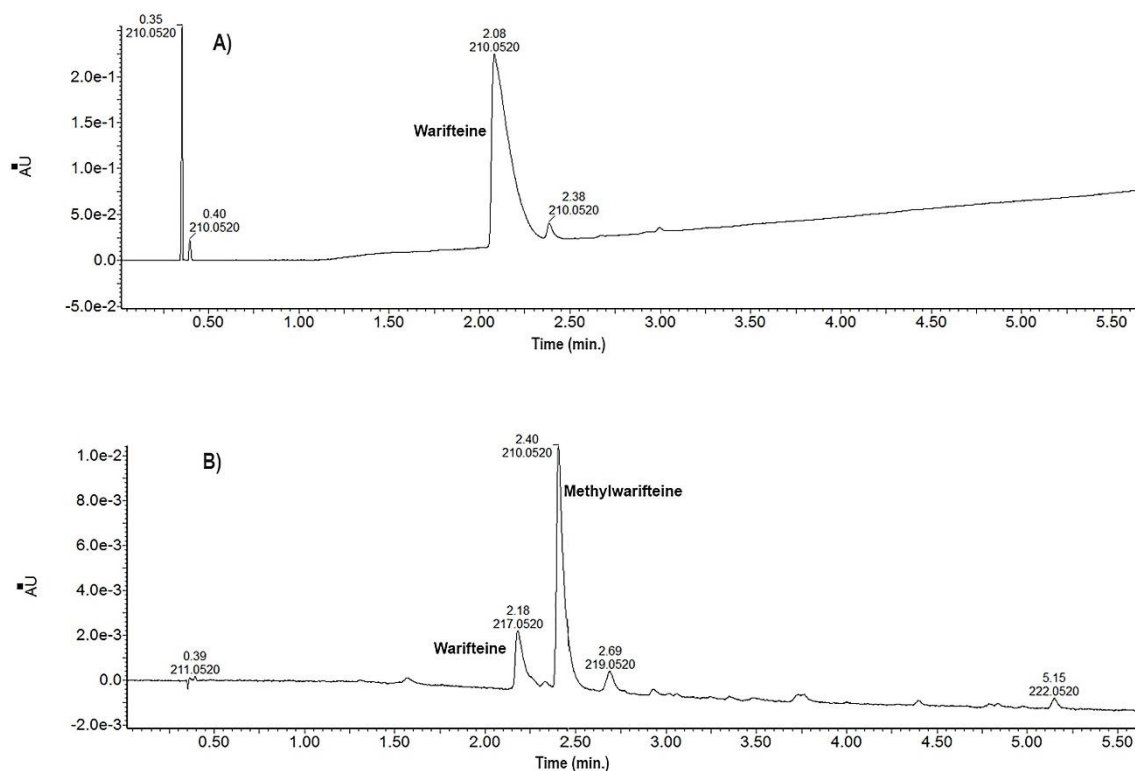
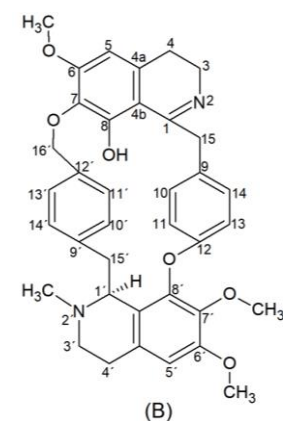
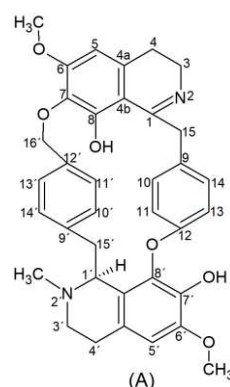


Figura 13. Cromatograma obtido pela técnica de cromatografia a líquido de ultra eficiência (UPLC) das Frações 5 (A) e 6 (B), mostrando tratar-se de warifteína e de uma mistura de metilwarifteína e warifteína (87,5:12,5) respectivamente.

Tabela 02. Comparação dos deslocamentos químicos de RMN de ^1H (obtidos em CDCl_3) das Frações 5 e 6 com os dados de referência para warifteina e metilwarifteina, respectivamente.

Próton	^1H (δ , ppm) Valor de referência para warifteina (MUKHERJEE; KEIFER, 2003b)	^a Multiplicidade / J (Hz) (MUKHERJEE; KEIFER, 2003b)	#H ^b	^1H (δ , ppm) Valor da amostra (Fração 05)
1', 3	3,18	td / 12,4, 4,5	2H	2,91
3, 15'	2,73	M	3H	2,82
4, 4', 15'	2,45	br m	4H	2,51
5	6,16	S	1H	6,20
10, 14	6,72	br d	2H	6,65
11, 13	6,60	d / 8,2	2H	6,50
4'	2,89	S	2H	2,91
5'	6,45	S	1H	6,52
10', 14'	7,01	d / 7,7	2H	7,00
11', 13'	6,88	d / 7,8	2H	6,95
16'	5,07	br m	2H	5,12
6-OMe	3,88	S	3H	3,91
6'-OMe	3,81	S	3H	3,80
2'-NMe	1,93	br s	3H	2,02

Próton	^1H (δ , ppm) Valor de referência para metilwarifteina (MUKHERJEE; KEIFER, 2003b)	^a Multiplicidade / J (Hz) (MUKHERJEE; KEIFER, 2003b)	#H ^b	^1H (δ , ppm) Valor da amostra (Fração 06)
1', 3	3,19	td / 12,5, 4,6	2	3,29
3, 15'	2,75	M	3	2,82
4, 4', 15'	2,50	br m	4	2,58
5	6,16	S	1	6,24
10, 14	6,84	br d	2	6,71
11, 13	6,64	d / 8,3	2	6,56
4'	2,91	br s	2	2,95
5'	6,51	S	1	6,48
10', 14'	7,02	d / 7,5	2	7,14
11', 13'	6,90	d / 7,5	2	6,97
16'	5,18	v br d / 11,2	1	5,24
16'	5,08	br d / 11,2	1	5,12
6-OMe	3,90	S	3	3,98
6'-OMe	3,82	S	3	3,90
7'-OMe	3,68	S	3	3,75
2'-NMe	1,97	br s	3	2,00



^as, singlete; d, doubleto; t, tripleto; m, multipeto; br: (broad) amplo.

^bNumber of integrated protons for the resonance signal

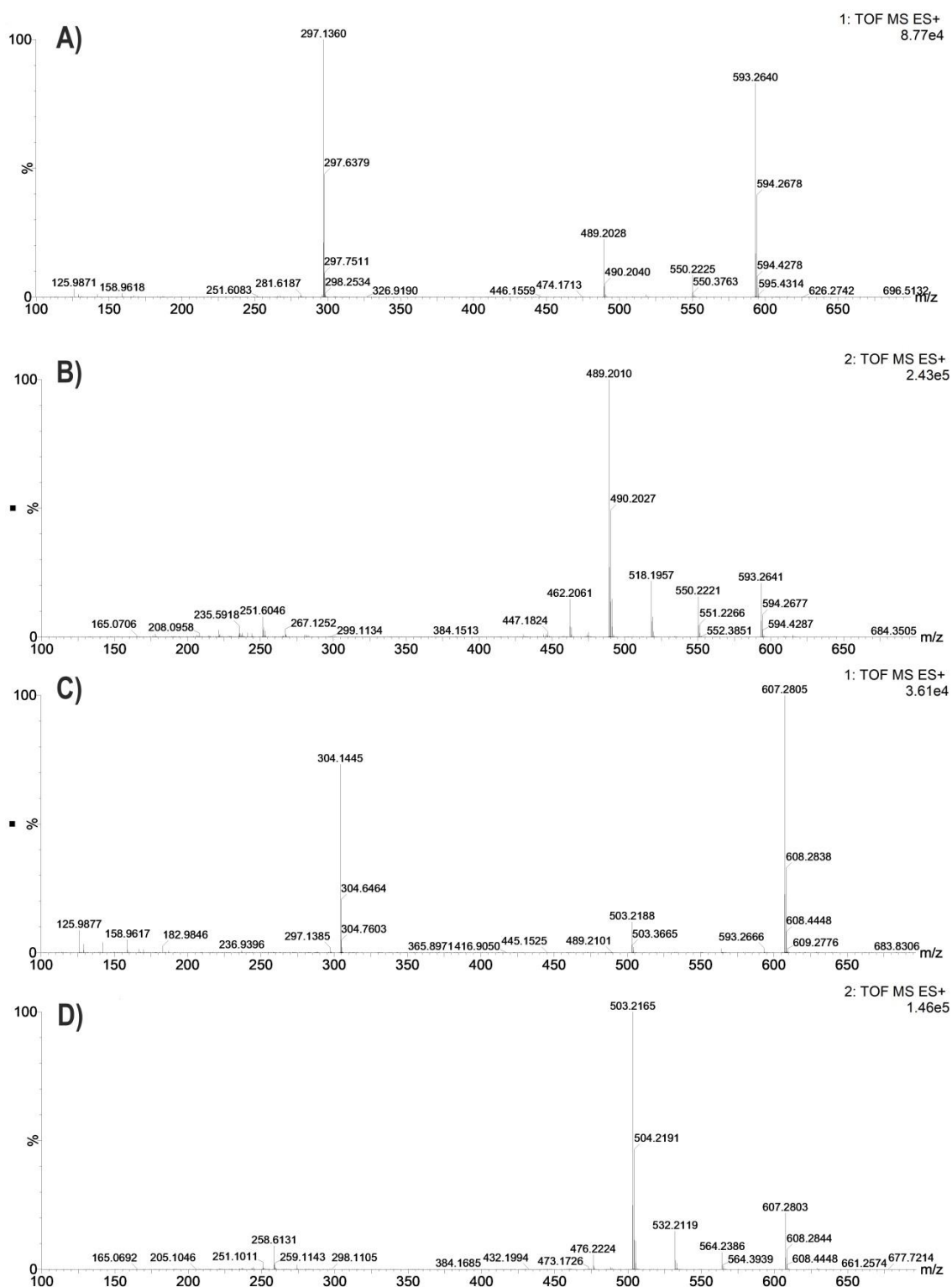


Figura 14. Espectro de massas de alta resolução por electrospray em modo positivo para as Frações 5 (A e B) e 6 (C e D). A e C são espectros obtidos com baixa energia de colisão e B e D espectros obtidos com alta energia de colisão.

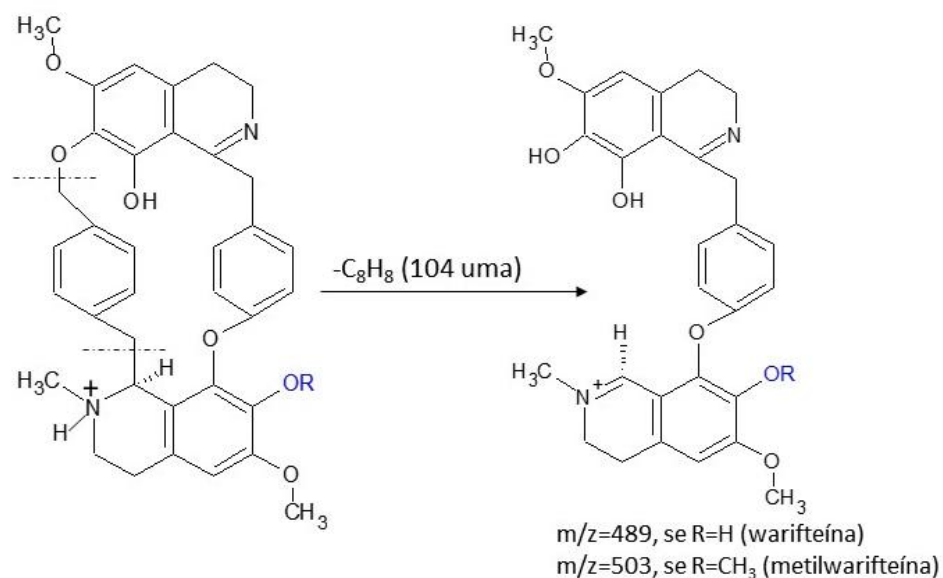


Figura 15. Mecanismo de fragmentação proposto para a warifteína e metilwarifteína com perda de radical *p*-xilil (104 uma).

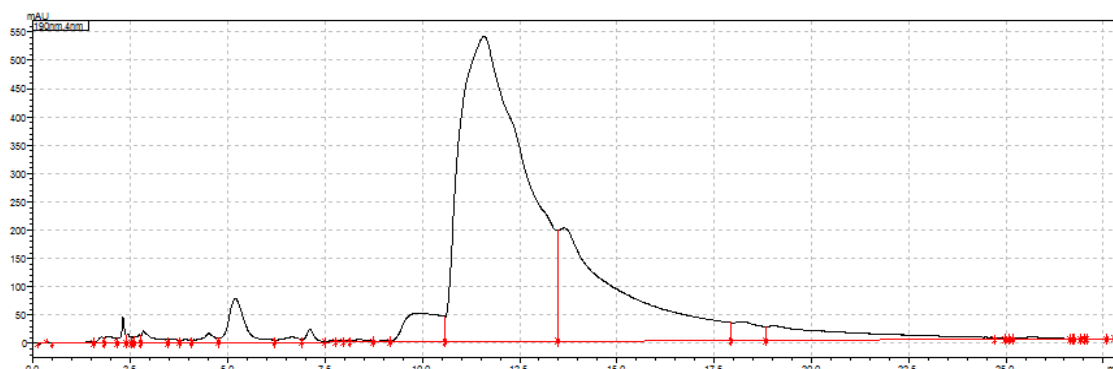


Figura 16. Cromatograma referente ao pico 6 previamente isolado por CLAE-prep. Condições cromatográficas: modo analítico, eluição isocrática de fase móvel metanol e água (80:20), e injeção 20 μL na diluição de 1:10 a partir da concentração estoque de 2 mg/mL.

4.6. Revisão Sistemática de Atividade Antitumoral de Alcaloides Bisbenzylisoquinólicos

Os produtos naturais formaram ao longo dos anos, o que podemos chamar de esqueleto de sustentação para o desenvolvimento de inúmeros medicamentos utilizados nas mais diversas terapias. Dentre os compostos

ativos estão os alcaloides (MISHRA; SINGH; SRIVASTAVA; TRIPATHI *et al.*, 2009).

Alcaloides são moléculas nitrogenadas, em que um átomo de nitrogênio geralmente integra o anel heterocíclico, possuindo assim característica básica, em sua maioria. Essas moléculas estão distribuídas na natureza, sendo que a maioria dessas possui uma atividade biológica associada (CARLI, 2001). Os alcaloides bisbenzilisquinolínicos são constituídos por duas unidades de benzilisquinolina (BI), ligadas entre si por pontes éter, ligação carbono-carbono ou ponte metilenodioxí. É possível observar diversos tipos de estruturas na configuração da molécula, que diferem entre si pelos tipos de ligações entre as porções isoquinolínicas, identificadas como cabeça, sendo o anel alifático identificado como cauda. (GUHA; MUKHERJEE; MUKHERJEE, 1979). Essas unidades podem apresentar três subtipos de esqueletos: benzilisquinolina (a), benziltetrahidroisoquinolina (b) e dehidrotetrahidroisoquinolina (c) (Figura 16), sendo que a variação das ligações entre os alcaloides é justificada pelos diferentes substituintes no anel aromático e quantidade e natureza das ligações entre as unidades benziltetrahidroisoquinolínicas (DIAS, 1999).

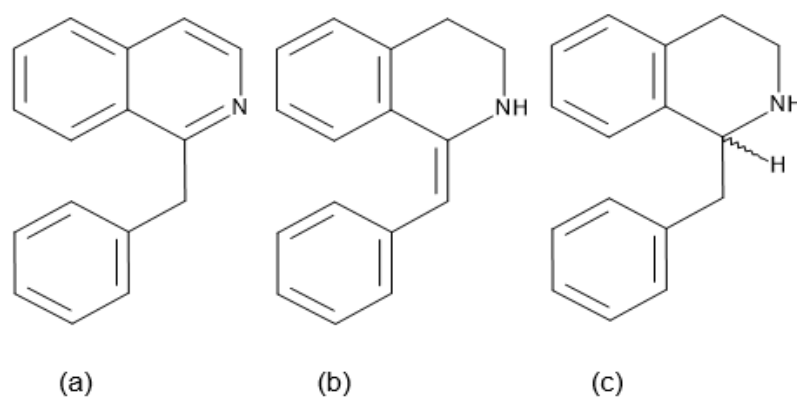
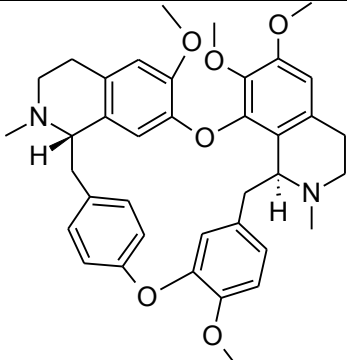
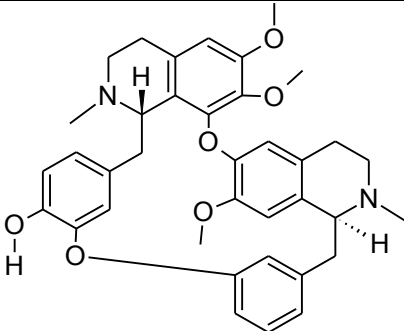
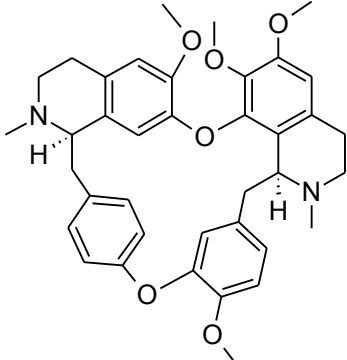
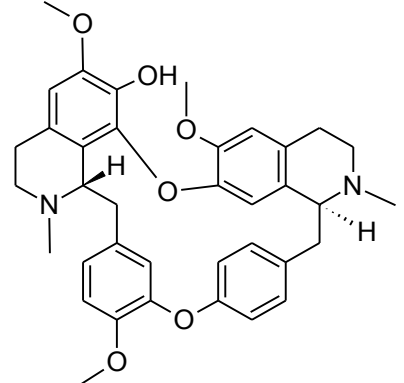
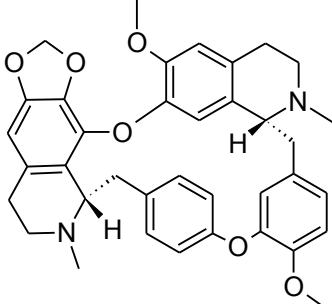
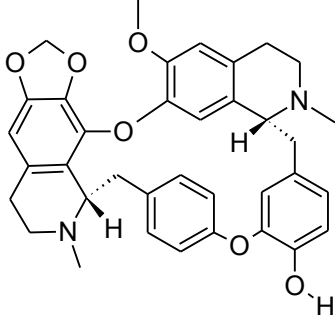
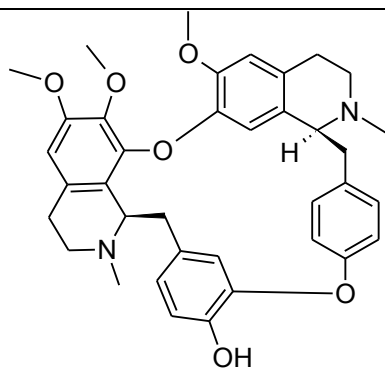


Figura 17. Esqueletos dos Subtipos de Benzilisquinolina: (a) benzilisquinolina, (b) benziltetrahidroisoquinolina e (c) dehidrotetrahidroisoquinolina.

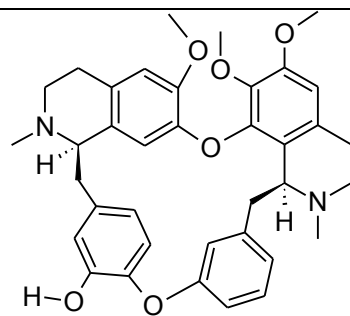
Atualmente existem mais de 400 ABBI, que diferem quanto a organização do arranjo estrutural (GUHA; MUKHERJEE; MUKHERJEE, 1979). Os estudos de atividade antitumoral, antibacteriana e antifúngica incluem ensaios com 41 diferentes ABBI, cujas estruturas químicas estão demonstradas no Quadro 01, contra 16 tumores, totalizando 45 linhagens e/ou

18 espécies bacterianas e/ou seis fúngicas. As porções isoquinolínicas são ligadas de cinco formas diferentes, podendo ser: uma ligação éter difenílico; duas ligações éter difenílico; uma ligação éter difenílico e uma benzil fenil éter; três ligações éter difenílico ou duas ligações éter difenílico e uma fenil benzil éter, situação que pode influenciar diretamente nas atividades biológicas relacionadas ao ABBI. O Quadro 02 apresenta a classificação estrutural dos alcalóides citados nas revisões de literatura como com atividade antitumoral, antibacteriana ou antifúngica.

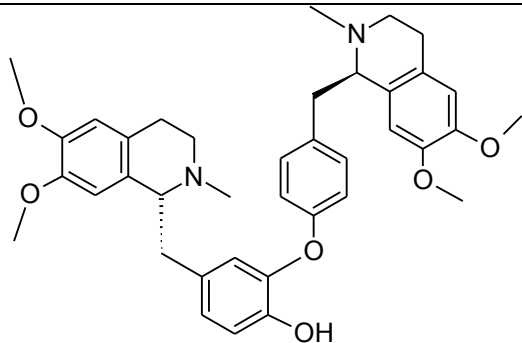
Quadro 01. Estruturas Químicas dos ABBI referenciados na revisão sistemática.	
 <p>Tetrandrina</p>	 <p>Thalicterina</p>
 <p>Isotetrandrina</p>	 <p>Fangchinolina</p>
 <p>Cepharantina</p>	 <p>Cepharonolina</p>



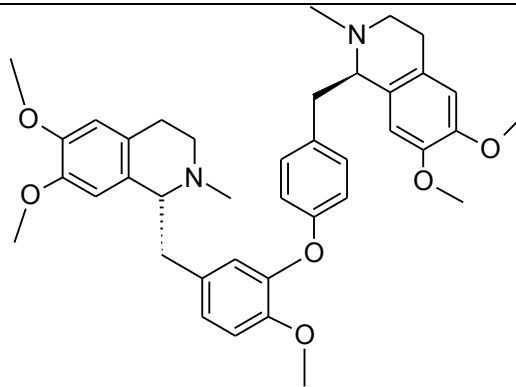
Berbamina



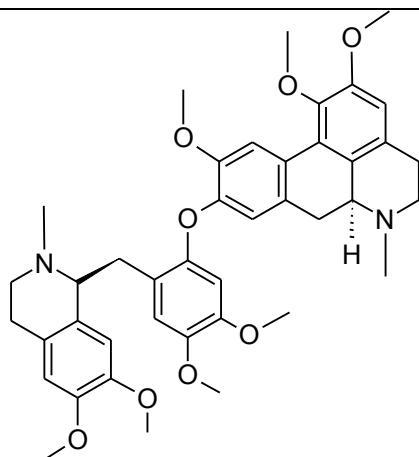
Oxiacantina



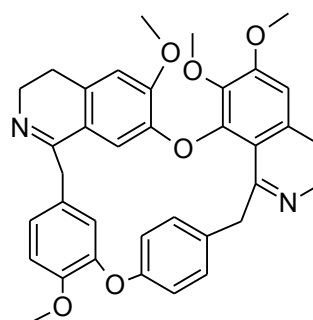
Dauricina



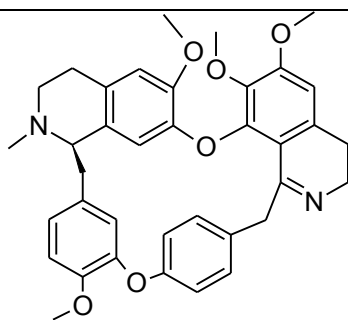
O-metildauricina



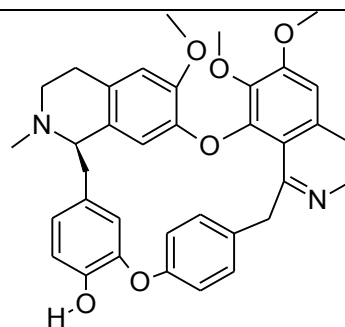
Thalicarpina



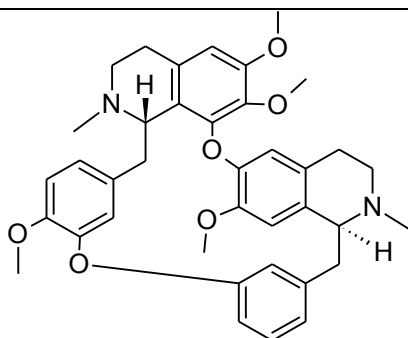
Stebisimina



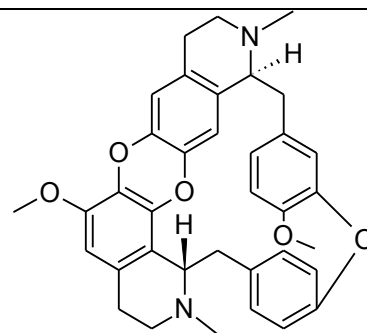
Epistephanina



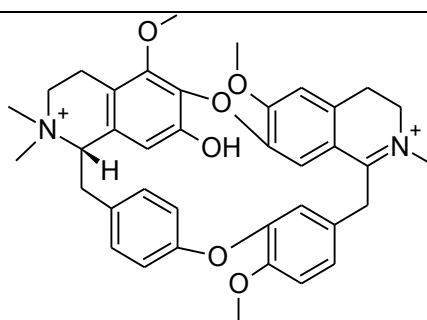
Hipoepistephanina



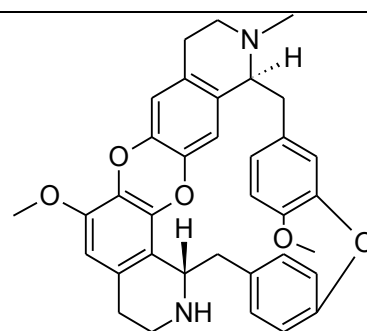
O – metilthalicberina



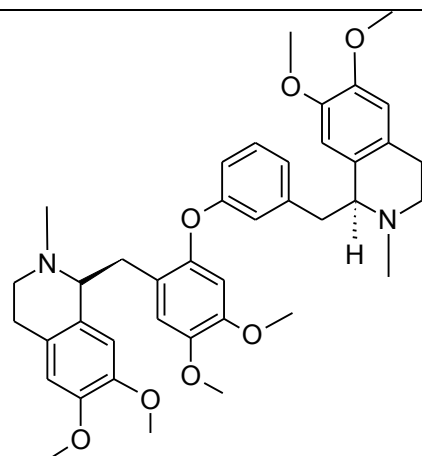
Isotrilobina



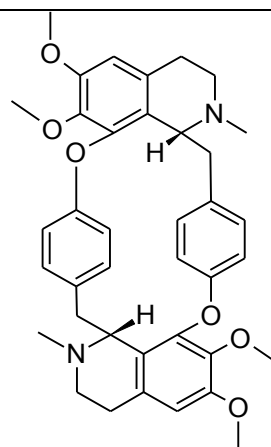
(+) - coccuorbiculatina A



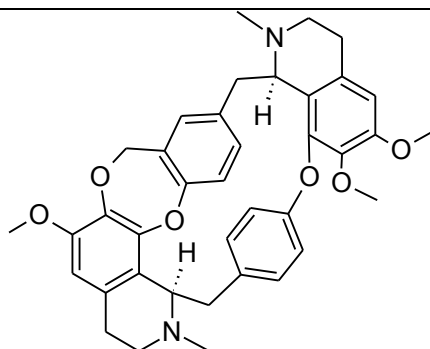
Trilobina



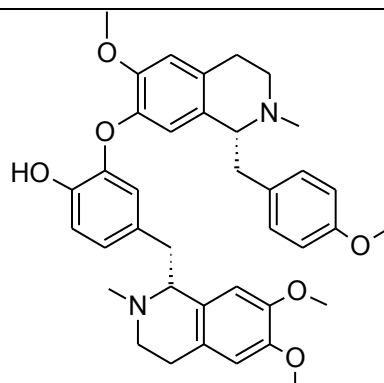
Tetrametilmagnolamina



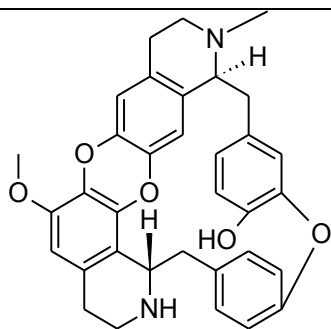
Cicleanina



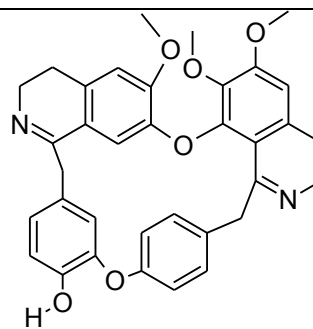
Insularina



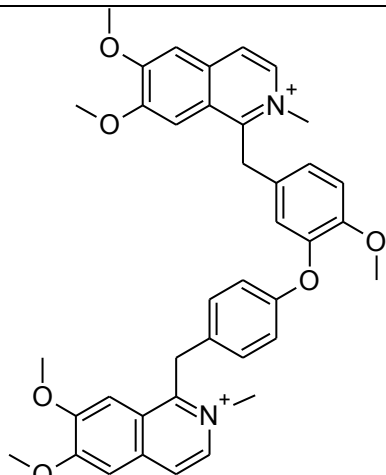
Neferina



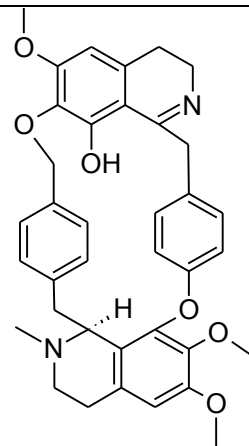
(+)- 2'-norcocculina



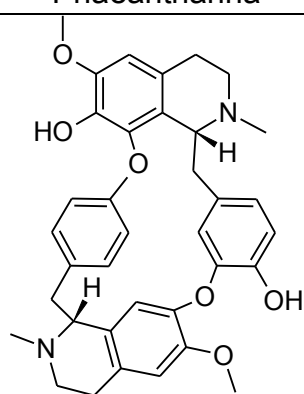
Puertogaline B



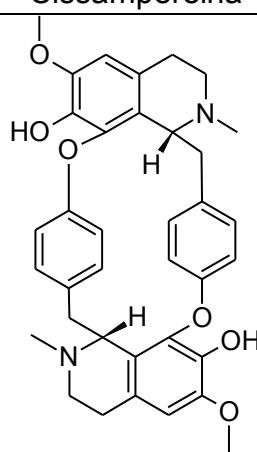
Phaeantharina



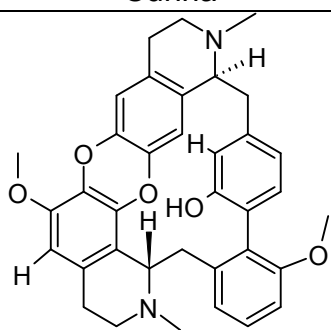
Cissampereina



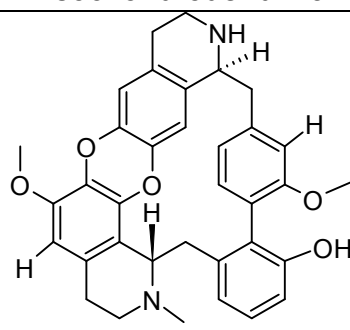
Curina



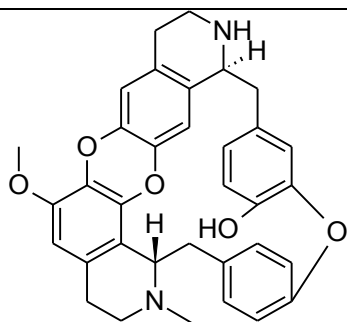
Isochondrodendrina



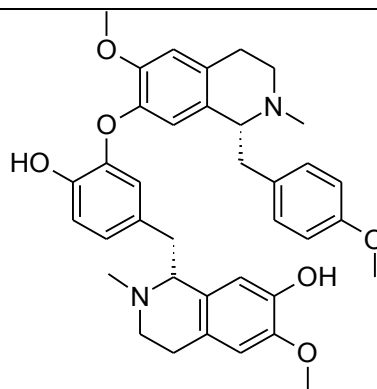
Tiliacarinina



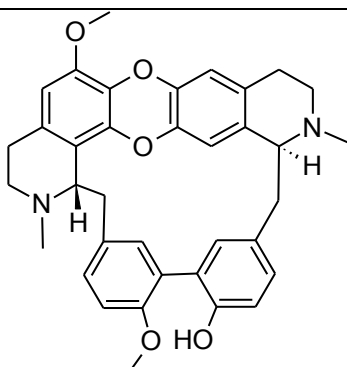
Tiliarina



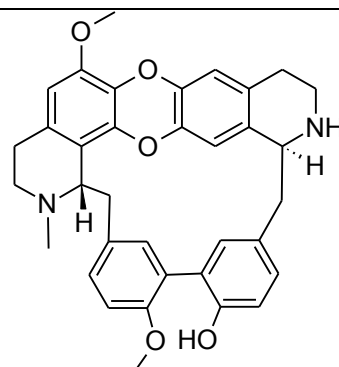
Coccolina



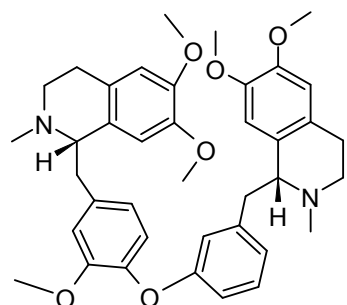
Isoliensinina



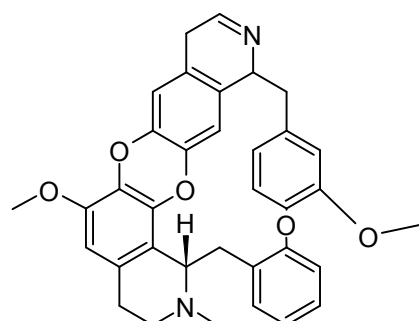
Tiliacorina



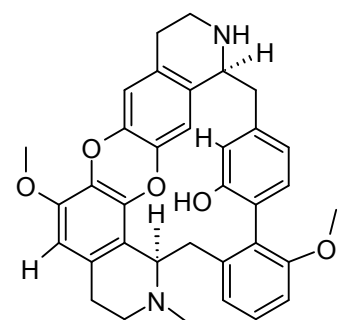
Nortiliacorinina



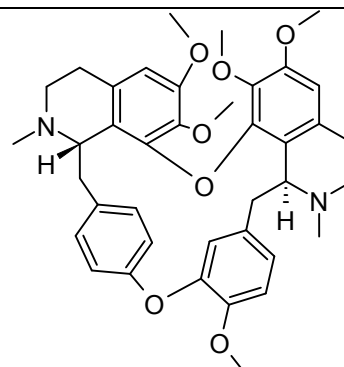
Dimetilgrisabina



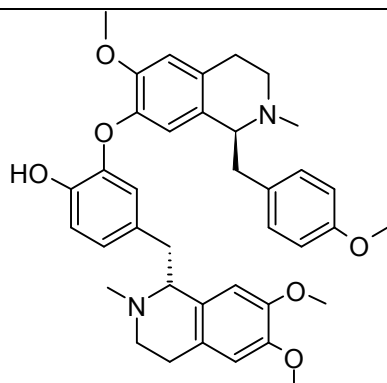
Dehidrotelobina



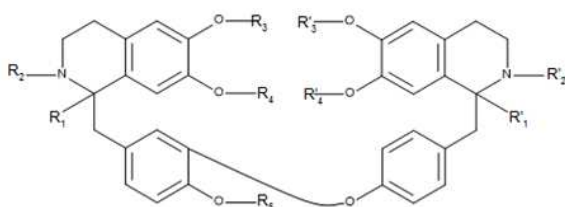
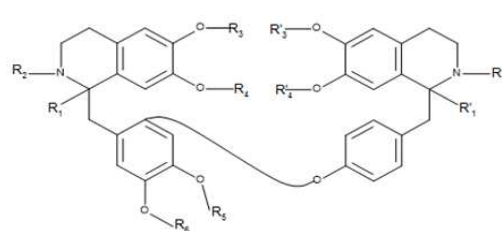
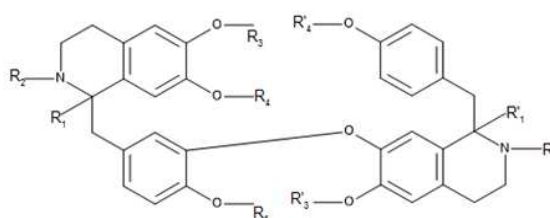
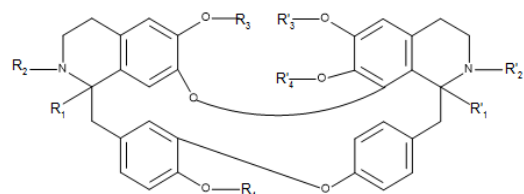
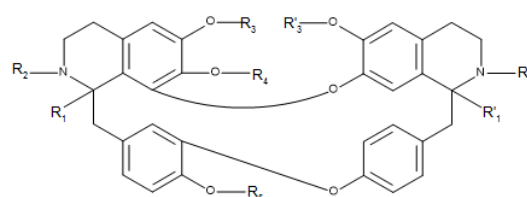
Nortiliacorina



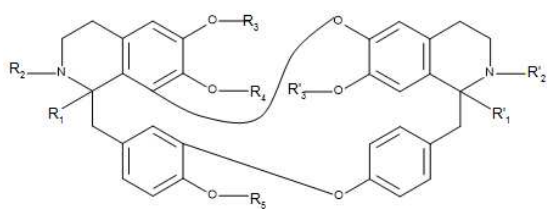
Dimetiltetrandrina



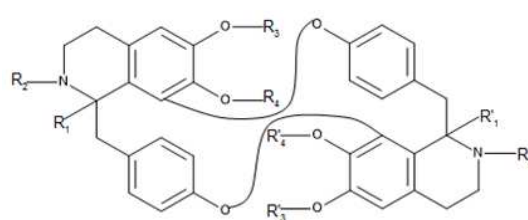
Liensinina

Quadro 02. Classificação estrutural dos ABBI citados na revisão sistemática.**Apenas uma ligação éter difenílico****I – Cauda a cauda****II – Cauda a cauda****V – Cauda a cauda****Duas ligações éter difenílico****VI – Cabeça a cabeça e cauda a cauda****VIII – Cabeça a cabeça e cauda a cauda**

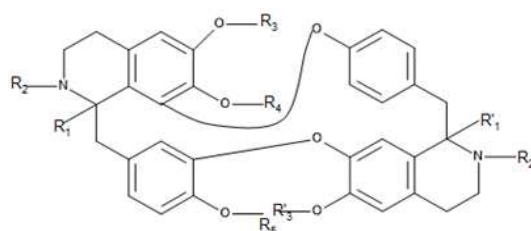
XI – Cabeça a cabeça e cauda a cauda



XX – Cabeça a cauda

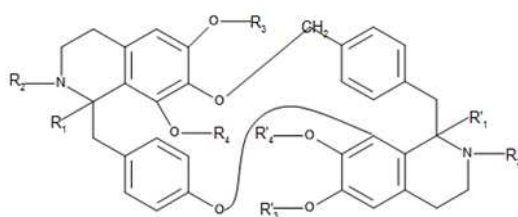


XXI – Cabeça a cauda



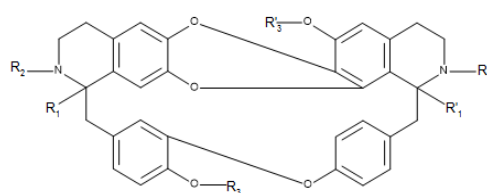
Uma ligação éter difenílico e uma benzil fenil éter

XXII



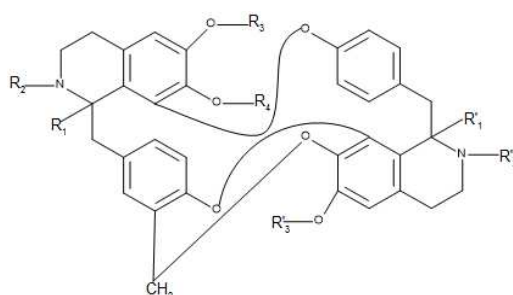
Três ligações éter difenílico

XXIII – Cabeça a cabeça e cauda a cauda



Duas ligações éter difenílico e uma fenil benzil éter

XXVI



Os resultados das publicações incluídos na revisão sistemática são apresentados a seguir em forma de tabela, sendo que a mesma está organizada de acordo com o tipo de tumor em ordem alfabética, para estudos de atividade antitumoral (Tabela 03), além de estudos de atividade antimicrobiana, com tabelas divididas entre espécies bacterianas (Tabela 05) e fúngicas (Tabela 07).

Tabela 03. Estudos de ABBI com atividade antitumoral.**TUMOR: BEXIGA**

Referência	ABBI	Ensaio e Métodos Realizados	Linhagem Celular	Resultados Obtidos	Origem
Qiu <i>et al.</i> , 2014 China	Tetrandrina	Citotoxicidade	EJ	Cl ₅₀ ≈ 5* µM com tratamento por 48h	Substância adquirida comercialmente
			J82	Cl ₅₀ ≈ 2,7* µM com tratamento por 48h	
Kou <i>et al.</i> , 2017 China	Tetrandrina	Autofagia	T24	10 µM com tratamento por 24h: formação de vacúolos autofágicos Western Blotting: Aumento de LC3-I, LC3-II e AMPK e redução de p62	Substância adquirida comercialmente
			5637		

TUMOR: CARCINOMA DE EHRLICH

Referência	ABBI	Ensaio e Métodos Realizados	Linhagem Celular	Resultados Obtidos	Origem
Kuroda <i>et al.</i> 1976 Japão	Tetrandrina	Sobrevida (<i>in vivo</i>)	ECA	50 mg/kg/dia tratamento por 60 dias ou até a morte: 10 dias a mais de sobrevivência para 50%	<i>Substância adquirida comercialmente</i>
	Thalicberina			62,5 mg/kg/dia tratamento por 60 dias ou até a morte: 20 dias ainda tinham 50% vivos	
	O-Metilthalicberina			62,5 mg/kg/dia tratamento por 60 dias ou até a morte: ~ 9 dias a mais	

TUMOR: COLO UTERINO

Referência	ABBI	Ensaio e Métodos Realizados	Linhagem Celular	Resultados Obtidos	Origem
Qiu <i>et al.</i> 2014 China	Tetrandrina	Citotoxicidade	HeLa	Cl ₅₀ ≈ 7,9* µM com tratamento por 48h	<i>Substância adquirida comercialmente</i>

Kuroda et al. 1976 Japão	Tetrandrina	Citotoxicidade	HeLa	DE ₅₀ : 4,4 µg/ml	Substância adquirida comercialmente
			HeLa-S₃	DE ₅₀ : 1 µg/ml	
	Tetrandrina (na forma de sal dimetiodeto)		HeLa	DE ₅₀ : >30 µg/ml	
	Isotetrandrina		HeLa	DE ₅₀ : 5,8 µg/ml	
			HeLa-S₃	DE ₅₀ : 10 µg/ml	
	Fangchinolina		HeLa	DE ₅₀ : 4,1 µg/ml	
	Cepharantina		HeLa	DE ₅₀ : 5,5 µg/ml	
			HeLa-S₃	DE ₅₀ : 7 µg/ml	
	Cepharonolina		HeLa	DE ₅₀ : >30 µg/ml	
	Berbamina		HeLa-S₃	DE ₅₀ : >10 µg/ml	

	Oxiacantina		HeLa-S ₃	DE ₅₀ : 3 µg/ml	
	Oxiacantina (Dimetiodeto)		HeLa	DE ₅₀ : >30 µg/ml	
	Thalicberina		HeLa	DE ₅₀ : 13 µg/ml	
	Dauricina		HeLa-S ₃	DE ₅₀ : 10 µg/ml	
	O-Metildauricina		HeLa	DE ₅₀ : 11 µg/ml	
	Thalicarpina		HeLa-S ₃	DE ₅₀ : 2,5 µg/ml	
	Stebisimina		HeLa	DE ₅₀ : 12 µg/ml	

	Epistephanina		HeLa	DE ₅₀ : 14 µg/ml	
	Hipoepistephanina		HeLa	DE ₅₀ : 12 µg/ml	
	Tetrametilmagnolina		HeLa	DE ₅₀ : 13 µg/ml	
	Trilobina		HeLa-S₃	DE ₅₀ : 1,1 µg/ml	
	Isotrilobina		HeLa-S₃	DE ₅₀ : 2 µg/ml	
	Cicleanina		HeLa	DE ₅₀ : 12 µg/ml	
	Cloridrato Isoliensinina		HeLa	DE ₅₀ : 16 µg/ml	

	Insularina (na forma de sal dimetiodeto)		HeLa	DE ₅₀ : >30 µg/ml	
--	--	--	------	------------------------------	--

TUMOR: CÓLON

Referência	ABBI	Ensaio e Métodos Realizados	Linhagem Celular	Resultados Obtidos	Origem
Wu <i>et al.</i> 2010	Tetrandrina	Citotoxicidade	CT-26	MTT: 100 µM LC ₅₀ :4,7 µM com tratamento por 24h.	Substância adquirida comercialmente
		Apoptose – Citometria de Fluxo		50 µM Mais de 50% de apoptose com tratamento por 24h	
		Apoptose (<i>In Vivo</i>) – Coloração TUNEL		Maior indução de apoptose nos ratos tratados com 150 mg/kg/dia de Tetrandrina	
		Sobrevida (<i>In Vivo</i>)		Sobrevida nos ratos tratados com 50 mg/kg/dia de Tetrandrina > controle e dosagem inferior	
		Tamanho do Tumor (<i>In Vivo</i>)		Maior redução dos tamanhos dos tumores com ratos tratados com 150 mg/kg/dia de Tetrandrina – para pequenos tumores.	
He <i>et al.</i> 2011 China	Tetrandrina	Atividade Antiproliferativa	HCT116	80 µM redução de mais de 95% de proliferação celular	
		Citotoxicidade	HCT116	MTT tratamento de 48h: 1,53 µM	
			SW480	MTT tratamento de 48h: 3,90 µM	

		Apoptose	HCT116	V-EGFP: 20 μM tratamento de 12h presença significativa de apoptose	
		Angiogênese		10 μM tratamento de 24h: Microscopia: Redução do número de colônias	
		Tamanho do Tumor (<i>In Vivo</i>)		5 μM Redução de migração celular em 75%	
				60 mg/kg/1x a cada 2 dias: redução significativa do tamanho, observado por bioluminescência (tumores com marcador antes do enxerto)	

TUMOR: GLIOMA

Referência	ABBI	Ensaio e Métodos Realizados	Linhagem Celular	Resultados Obtidos	Origem
Chen et al. 2009	Tetrandrina	Citotoxicidade (<i>In vitro</i>) MTT	Glioma RT-2	MTT: LC ₅₀ :11,3 μ M com tratamento por 72h	Substância adquirida comercialmente
		Apoptose (<i>In vitro</i>)		Inibição da angiogênese em 52,7% com tetrandrina 75 μ M por 72h	
		Expressão VEGF (<i>In vitro</i>)		RT-PCR 24h: 25 μ M de Tetrandrina: 70% Western Blotting 24h: 25 μ M de Tetrandrina: 91%	
		Angiogênese (<i>In Vivo</i>) Tampão Matrigel		bFGF: Hb no tampão com tetrandrina 100 μ M e bFGF < que o de bFGF apenas (p=0,001) e > que PBS (p=0,005)	
		Tamanho do Tumor (<i>In Vivo</i>)		Maior redução dos tamanhos dos tumores com ratos/camundongos tratados com 150 mg/kg/dia de Tetrandrina	
		Sobrevida (<i>In Vivo</i>)		Sobrevida nos ratos tratados com 150 mg/kg/dia de Tetrandrina > controle e dosagem inferior	

Wu et al. 2013	Tetrandrina	Proliferação celular – Matrigel	U-87	Redução da migração e invasão de células tumorais	Substância adquirida comercialmente
		Proliferação celular – CCK-8		Inibe a proliferação celular	
		RT-PCR		20 µM com tratamento por 48h: Redução da atividade e expressão de ADAM17, p-EGFR, p-AKT em, aproximadamente 30, 45 e 30% respectivamente.	
Ma et al. 2015	Tetrandrina	Viabilidade Celular (<i>In vitro</i>)	U-87	Microscopia: alterações morfológicas em 15 µg/ml tratamento por 24h. MTT: CI_{50} : 10.81±3.21 µg/ml e redução de ≈ 80%* de células viáveis;	
			U – 251	Microscopia: alterações morfológicas em 60 µg/ml tratamento por 24h. MTT: CI_{50} : 56.1±4.76 µg/ml e redução de ≈ 80%* de células viáveis;	
			SWO-38	Microscopia: Redução de mais de 80%* de células viáveis; alterações morfológicas em 60 µg/ml tratamento por 24h. MTT: CI_{50} : 50.05±3.14 µg/ml e redução de ≈ 80%* de células viáveis;	
		Apoptose (<i>In vitro</i>)	U-87	30 µg/ml com tratamento de 24h: ≈ 52% apoptose	
		Apoptose (<i>In Vivo</i>)	U-87	TUNEL, coloração DAPI: 4 e 8 mg/ml: redução de ≈ 70% na expressão de PCNA	
		Angiogênese	U-87	60 µg/ml com tratamento de 24h: aumento de células em G0 e G1 e redução em S e G2.	
		Tamanho do Tumor (<i>In Vivo</i>)	U-87	Maior redução dos tamanhos dos tumores tratados com 8 mg/ml de Tetrandrina por 5 dias	

		Níveis de Proteínas – Western Blotting	U-87	15 µg/ml Aumento de Bcl-2 (Bax)	
--	--	--	------	---------------------------------	--

TUMOR: HEPÁTICO

Referência	ABBI	Ensaio e Métodos Realizados	Linhagem Celular	Resultados Obtidos	Origem
Liu <i>et al.</i> 2010	Tetrandrina	Viabilidade Celular	HepG2	Tratamento por 24h 10 µM: 70%* 30 µM: 60%* **	<i>Substância adquirida comercialmente</i>
			Huh7	Tratamento por 24h 10 µM: 40%* 30 µM: 20%*	
		Apoptose	HepG2	- Aumento de Bcl-xL - Aumento de ROS: 3h de tratamento para Huh7 e 12h para BEL7402	
			Huh7 e BEL7402 5 a 30 µM	- Declínio nos níveis de c-(FLIP) L, Bid, Bel2 e Mcl1 (paralelo à ativação de caspases) - Induzia a clivagem de caspase-8 e -9 e PARP. - Aumento dos níveis de ERO 3 h para Huh7 e 12h para BEL7402	
		Tamanho do Tumor (<i>In Vivo</i>)	HepG2	Maior redução dos tamanhos dos tumores com ratos/camundongos tratados com 100 mg/kg a cada 2 dias de Tetrandrina	
Yoon <i>et al.</i> 2013	Neferina	Viabilidade Celular	Hep3B	30 µM tratamento por 24h: redução de mais de 90% de células viáveis	<i>Nelumbo nucifera</i>
		Apoptose – Microscopia		20 e 25 µM tratamento por 6 e 24h: Sinais morfológicos: encolhimento de membrana e condensação no núcleo célula,	

				respectivamente.	
		Apoptose		Western Blotting: 20 μ M tratamento por 24h: aumento de Bak e Puma Aumento da expressão de caspases -8, -3, -6 e -7 e PARP.	
Yoo <i>et al.</i> 2002 Coréia do Sul	Tetrandrina	Citotoxicidade	HepG2	MTT: 24 μ M tratamento por 48h CI ₅₀ : 9.09 \pm 1.0 mM	Substância adquirida comercialmente
		Apoptose – Citometria de Fluxo		24 μ M tratamento por 24h Aumento de \approx 60%	
		Apoptose		Wertern Blotting: 16 μ M tratamento por 24h Ativação de caspase -3 e clivagem de PARP	
Chang e Wu, 2005 China	(+) - coccuorbiculatine A	Citotoxicidade	HepG2	CI ₅₀ : >30 μ g/ml	Cocculus orbiculatus
			Hep3B	CI ₅₀ : >30 μ g/ml	
Qiu <i>et al.</i> 2014 China	Tetrandrina	Citotoxicidade	HepG2	CI ₅₀ \approx 6,8* μ M com tratamento por 48h	Substância adquirida comercialmente
			BEL-7402	CI ₅₀ = 8,03 μ M com tratamento por 48h	
Gong <i>et al.</i> 2012 China	Tetrandrina	Apoptose	BEL7402	5 μ M com tratamento por 24h: Aumento da expressão de LC3-II	Substância adquirida comercialmente
			HepG2	5 μ M com tratamento por 24h: Aumento da expressão de LC3-II	
			Huh-7	5 μ M com tratamento por 24h: Aumento da expressão de LC3-II	

		Tamanho do Tumor (<i>In Vivo</i>)	Huh-7	50 mg/kg/dia por 20 dias: Redução em 44% do tamanho do tumor.	
		Apoptose (<i>In Vivo</i>)		80 µM com tratamento por 24h: Aumento de GFP::LGG-1	

TUMOR: MAMA

Referência	ABBI	Ensaio e Métodos Realizados	Linhagem Celular	Resultados Obtidos	Origem
Liu et al. 2013 Andover	Stebisimina	Citotoxicidade (<i>In vitro</i>)	MCF-7	Cl ₅₀ >10 µM	<i>Anysocycla grandidieri</i>
	(+)- 1,2 dehydrotelobina			Cl ₅₀ : 4,23 ± 1,27 µM	
	(+) - 2' – norcocsulina			Cl ₅₀ >1,11 < 3,33 µM	
	Puertogaline B			Cl ₅₀ >10 Mm	
Chang e Wu, 2005 China	(+) - coccuorbiculatine A	Citotoxicidade	MCF-7	Cl ₅₀ : >30 µg/ml	<i>Cocculus orbiculatus</i>
			MDA-MB-231	Cl ₅₀ : >30 µg/ml	
Qiu et al. 2014 China	Tetrandrina	Citotoxicidade	MCF-7	Cl ₅₀ ≈ 5,8* µM com tratamento por 48h	<i>Substância adquirida comercialmente</i>
Zhang et al. 2015	Isoliensinina	Citotoxicidade	MDA-MB-231	Cl ₅₀ : 18,4 µM com tratamento por 72h	<i>Substância adquirida comercialmente</i>

China	Isoliensinina	Viabilidade Celular	MDA-MB-231	10 μ M com tratamento por 48h: redução de mais de 90 colônias	
	Isoliensinina		MDA-MB-436	20 μ M com tratamento por 48h: redução de mais de 160 colônias	
	Isoliensinina		MDA-MB-436	10 μ M com tratamento por 48h: redução de mais de 60 colônias	
	Isoliensinina		MCF-7	5 μ M com tratamento por 48h: redução de mais de 150 colônias	
	Isoliensinina		MDA-MB-231	40 μ M com tratamento por 72h: redução de mais de 80% de células viáveis	
	Liensinina		MDA-MB-231	40 μ M com tratamento por 72h: redução \approx 40% de células viáveis	
	Neferina		MDA-MB-231	40 μ M com tratamento por 72h: redução \approx 60% de células viáveis	
	Isoliensinina	Angiogênese	MDA-MB-231	20 μ M com tratamento por 48h: aumento de células em G1 e redução em S e G2	
		Apoptose – Níveis de Proteínas	MDA-MB-231	Western Blotting: 20 μ M com tratamento por 48h: Diminuição de ciclina E, aumento de p21	
		Apoptose	MDA-MB-231	40 μ M com tratamento por 48h: 26,4% a mais de células apoptóticas	
				20 μ M com tratamento por 72h: 27,6% a mais de células apoptóticas	
				20 μ M aumento de ERO 4,2 x mais para 48h de tratamento e ativação de p38, MAPKe JNK.	
He et al. 2011 China	Tetrandrina	Citotoxicidade	MDA-MB-468	MTT tratamento de 48h: 1,25 μ M	Substância adquirida comercialmente

			MDA-MB-231	MTT tratamento de 48h: 1,89 μ M	
--	--	--	-------------------	-------------------------------------	--

TUMOR: NASOFARINGE

Referência	ABBI	Ensaio e Métodos Realizados	Linhagem Celular	Resultados Obtidos		Origem
Kupchan <i>et al.</i> 1965 Índia	Cissampareina	Citotoxicidade	KB	DE ₅₀ 1,1 mcg/ml	DE ₅₀ 2,5 mcg/ml	<i>Cissampelos parreira</i> Linn
	I-curina			DE ₅₀ 0,14 mcg/ml		
	d-isochoondrodendrina			DE ₅₀ 0,17 mcg/ml		
	Fangchinolina			DE ₅₀ 0,12 mcg/ml		
	d-tetrandrina			DE ₅₀ 0,091 mcg/ml		
Lin <i>et al.</i> 2016 Taiwan	Tetrandrina	Viabilidade Celular	NPC – TW 076	9 µM com tratamento por 48h Citometria Fluxo: Redução >60% de células viáveis Alteração da morfologia celular em 10 µM com tratamento por 48h CI ₅₀ : 8,2 µM		<i>Substancia isolada adquirida comercialmente</i>
		Apoptose		Aumento da produção de ERO e Ca ²⁺ 10 µM com tratamento por 48h: Aumento s células de ≈30% em G0-G1, e redução ≈10% em G2-M e S.		
				Western Blotting: 8 µM com tratamento por 48h: Aumento da expressão de		

				GADD153, GRP78, ATF-6 α e ATF-6 β	
--	--	--	--	--	--

TUMOR: ORAL

Referência	ABBI	Ensaio e Métodos Realizados	Linhagem Celular	Resultados Obtidos	Origem
Yu <i>et al.</i> 2014	Tetrandrina	Viabilidade Celular – Microscopia e citometria de fluxo	HSC-3	30 μ M com tratamento por 24h: Redução significativa na quantidade de células e alteração morfológica das mesmas.	<i>Substância adquirida comercialmente</i>
		Indução de Apoptose – DAPI		40 μ M tratamento 24 e 48h Redução de mais de 80% de células viáveis.	
		Autofagia – Microscopia		Induz a condensação de DNA	
		Autofagia – relação com morte celular		20 μ M com tratamento por 16h Induz autofagossomos	
		Níveis de proteínas associadas a autofagia e apoptose – Western Blotting		MDC (10, 20 E 30 μ M/6h) e exame microscópico (20 μ M/16h): formação de AVO.	
				25 μ M com tratamento por 24h: - Aumento de LC-3-I e II, PARP e Caspase -3, -8 e -9. - Inibição de p65, ULK1, p-ULK1, pAKT. Raptor, pGSK, p-70S6, p-s6, Atg5 e Atg7 (após 6h), e p-mTOR (após 12h).	
Lien <i>et al.</i> 2016	Tetrandrina	Viabilidade Celular	CAL27	40 μ M \approx 100% morte celular 20 μ M-24h \approx 50% células viáveis Redução significativa na quantidade de células e alteração morfológica das mesmas.	<i>Substância adquirida comercialmente</i>

		Autofagia – Microscopia		30 μ M com tratamento por 24h – Formação de ERO, Ca^{2+} e redução de $\Delta\Psi_m$	
		Níveis de proteínas associadas a autofagia e apoptose – Citometria de fluxo		20 μ M tratamento por 16h: Formação de AVO; Aumento de citocromo C e AIF, Bax e Baf, LC-3-I e II, PARP, Atg5, Atg12, Beclin-1 e p-ULK1 e redução de Endo G, Bcl-2, Bcl-xL e Bid, p-mTOR, mTOR, p-S6 e p-70S6.	
		Atividade de caspases – Citometria de fluxo		20 μ M: aumento de Caspase -3 (pico em 12h), -8 e -9 (picos em 24h).	
		Proliferação celular com Pré-tratamento de siRNAs de Atg5 e Beclin-1, associado ao tratamento com tetrandrina.		20 μ M Redução de mais de 50% da proliferação relativa	

TUMOR: OSTEOSARCOMA

Referência	ABBI	Ensaio e Métodos Realizados	Linhagem Celular	Resultados Obtidos	Origem
He et al. 2011 China	Tetrandrina	Citotoxicidade	MG63	MTT tratamento de 48h: 5,71 μ M	Substância adquirida comercialmente

TUMOR: OVÁRIO

Referência	ABBI	Ensaio e Métodos Realizados	Linhagem Celular	Resultados Obtidos	Origem
Liu <i>et al.</i> 2013 Andover	Stebisimina	Citotoxicidade (<i>In vitro</i>)	A2780	CI ₅₀ >20 µM	<i>Anysocycla grandidieri</i>
	(+) - 1,2 dehydrotelobina			CI ₅₀ : 4,1 ± 0,3 µM	
	(+) - 2' – norcocsulina			CI ₅₀ : 2,7 ± 0,3 µM	
	Puertogaline B			CI ₅₀ >20 µM	
Xu <i>et al.</i> 2016 China	Neferina	Viabilidade Celular – MTT	A2780	10 µM Tratamento por 72h: CI ₅₀ : 9,24 µM	Substância adquirida comercialmente
		Angiogênese	A2780	2 µM: Redução em mais de 70% a formação de células tumorais*	
			SKOV3	2 µM: Redução em mais de 50% a formação de células tumorais*	
		Apoptose – Citometria de Fluxo	A2780	Tratamento por 24h: 10 µM: 79,5% em G1 10 µM: 17,92% em S	
		Apoptose - Níveis de proteínas - Iodeto de Propídio	A2780	15 µM tratamento por 24h: 47,8% células apoptóticas Aumento de p21 e p27 e redução de ciclina D1	
		Indução de Autofagia – Microscopia	A2780	10 µM tratamento por 24h: Presença autofagossomos	

		Indução de Autofagia – Níveis de proteínas – Immunoblot	A2780	10 µM tratamento por 24h: Autofagia mediada por p38 MAPK e JNK	
--	--	--	--------------	---	--

TUMOR: PELE

Referência	ABBI	Ensaio e Métodos Realizados	Linhagem Celular	Resultados Obtidos	Origem
Liu <i>et al.</i> 2013 Andover	Stebisimina	Citotoxicidade (<i>In vitro</i>)	UACC-257	CI ₅₀ >10 µM	<i>Anysocycla grandidieri</i>
	(+) - 1,2 dehydrotelobina			CI ₅₀ : 3,37 ± 1,01 µM	
	(+) - 2' – norcocsulina			CI ₅₀ : 6,37 ± 1,91 µM	
	Puertogaline B			CI ₅₀ >10 µM	
Yasukawa <i>et al.</i> 1991 Japão	Cepharantina	Carcinogênese (<i>In Vivo</i>)		0,005% Cepharantina na dieta após 18 semanas: Redução de ≈ 4 tumores/animal	<i>Fornecido por colaborador.</i>
		Carcinogênese (<i>In Vivo</i>)		2,5µg TPA (em acetona) 2x/semana por duas semanas seguido de 2,5µg mezereina (em acetona) 2x/semana até a semana 23. 30% a menos de animais portando o tumor, com redução de ≈ 4 tumores/animal.	
		Indução epidérmica de ODC por TPA e mezereina		Aumento de ODC com 5 µg de TPA ou mezereina.	

TUMOR: PÂNCREAS

Referência Ano/	ABBI	Ensaio e Métodos Realizados	Linhagem Celular	Resultados Obtidos	Origem
Qiu <i>et al.</i> 2014 China	Tetrandrina	Citotoxicidade	PANC-1	CI ₅₀ ≈ 7,7* µM com tratamento por 48h	Substância adquirida comercialmente
		Apoptose – Níveis de Proteínas		10 µM clivagem de caspase -3 e PARP	

TUMOR: PRÓSTATA

Referência Ano/	ABBI	Ensaio e Métodos Realizados	Linhagem Celular	Resultados Obtidos	Origem
Qiu <i>et al.</i> 2014 China	Tetrandrina	Citotoxicidade	PC-3	CI ₅₀ ≈ 7,8* µM com tratamento por 48h	Substância adquirida comercialmente
			DU145	CI ₅₀ = 2,62 µM com tratamento por 48h	
		Apoptose tardia	PC-3	Citometria de Fluxo: 10 µM com tratamento por 48h	
		Apoptose em Cultura Primária		Citometria de Fluxo: 10 µM com tratamento por 48h	
		Apoptose – Níveis de Proteínas		10 µM clivagem de caspase -3 e PARP	
		Tamanho do Tumor (<i>In Vivo</i>)		60 mg/kg uma injeção a cada dois dias por 27 dias: Redução de ≈ 51%* em tamanho e 0,13 g em peso.	

		Autofagia		Aumento da quantidade de autofagossomos	
He et al. 2011 China	Tetrandrina	Citotoxicidade	PC-3	MTT tratamento de 48h: 4,34 μ M	Substância adquirida comercialmente
			DU145	MTT tratamento de 48h: 3,17 μ M	
Li et al. 2015 China	Fangchinolina	Viabilidade Celular	PC-3	MTT: 40 μ M com tratamento por 72h Redução > 90%, mas células viáveis	Substância adquirida comercialmente
			LnCap	MTT: 40 μ M com tratamento por 72h Redução de 80% nas células viáveis	
		Angiogênese	PC-3	40 μ M com tratamento por 24h: Aumento de 18,33% de células em G0-G1 e redução de 0,67 e 17,67% em G2-M e S, respectivamente.	
		Tamanho do Tumor		50 mg/kg após 30 dias redução de \approx 50% do tumor	

TUMOR: PULMÃO

Referência Ano/	ABBI	Ensaio e Métodos Realizados	Linhagem Celular	Resultados Obtidos	Origem
Poornima et al. 2013	Neferina	Citotoxicidade (<i>In vitro</i>) MTT	H520	CI ₅₀ : 8* μ M com tratamento por 48h	Nelumbo nucifera Gaertn
			H661	CI ₅₀ : 14* μ M com tratamento por 48h	
			H441	CI ₅₀ : 10* μ M com tratamento por 48h	
			A549	CI ₅₀ : 16* μ M com tratamento por 48h	
		Apoptose (<i>In vitro</i>) Coloração com Iodeto de Propídio	A549	Acúmulo de Neferina na fase sub-G1 do ciclo celular	
		Mecanismos moleculares		- Diminuição da razão Bcl 2/ Bax - Expressão diminuída de Caspase-9 e -3 clivadas - Dissipação de $\Delta\Psi$ M e Cit-C	

				- Inibição de ciclina D1 e aumento da expressão de p-27	
		Apoptose – via ERO – por corante fluorescente		Aumento de ERO com pico após 30 min de incubação	
		Ca ⁺ intracelular por FURA-2/AM		Aumento de Ca ⁺ intracelular	
				Aumento de peroxidação lipídica e do acúmulo de lipídio intracelular	
Liu <i>et al.</i> 2013 Andover	Stebisimina	Citotoxicidade (<i>In vitro</i>)	H460	Cl ₅₀ >10 Mm	<i>Anysocycla grandidieri</i>
	(+) - 1,2 dehydrotelobina			Cl ₅₀ : 2,18 ± 0,65 µM	
	(+) - 2' – norcocsuline			Cl ₅₀ >3,33 <10 µM	
	Puertogaline B			Cl ₅₀ >10 µM	
Sivalingam <i>et al.</i> 2019	Neferina	Atividade Antioxidante	Indução de carcinogênese por dietilnitrosamina		<i>Nelumbo nucifera Gaertn</i>
		Histopatologia		20 mg/kg/20 dias alternados: ≈20 % a menos de células inflamatórias e a mais de espaço alveolar	
		Estresse oxidativo		DCFH-DA: Diminuição de ERO Ácido Tiobarbitúrico: Diminuição de peroxidação lipídica	
		Carcinogênese – Níveis de glicoproteínas		20 mg/kg/20 dias alternados: Aumento de hexose, hexoseamine, fucose e ácido siálico em ≈55, 55, 50 e 100%.	
		Apoptose – Níveis de Proteínas		Imunoblot: Aumento da expressão de p53, Bax e caspases -9 e -3 Diminuição de Bcl-2	
Qiu <i>et al.</i> 2014 China	Tetrandrina	Citotoxicidade	NCI-H460	Cl ₅₀ ≈ 7,7* µM com tratamento por 48h	Substância adquirida comercialmente

TUMOR: RENAL

Referência Ano/	ABBI	Ensaio e Métodos Realizados	Linhagem Celular	Resultados Obtidos	Origem
Qiu <i>et al.</i> 2014 China	Tetrandrina	Citotoxicidade	786-O	CI ₅₀ ≈ 6,5* µM com tratamento por 48h	<i>Substância adquirida comercialmente</i>
		Apoptose tardia		Citometria de Fluxo: 10 µM com tratamento por 48h	
		Apoptose em Cultura Primária		Citometria de Fluxo: 10 µM com tratamento por 48h	
		Apoptose – Níveis de Proteínas		10 µM clivagem de caspase -3 e PARP	
		Autofagia		Aumento da quantidade de autofagossomos	
Zhang e Qiu, 2018 China	Dauricina	Citotoxicidade	786-O	CI ₅₀ : 13.42±2.1 µM	<i>Substância adquirida comercialmente</i>
			Caki-1	CI ₅₀ : 8.46±1.3 µM	
			A-498	CI ₅₀ : 18.28±0.6 µM	
			ACHN	CI ₅₀ : 11.36±1.5 µM	
		Angiogênese	786-O	20 µM com tratamento 24h: aumento de 25%* células em G0- G1 e redução >20%* em S. Western Blotting: Aumento da expressão de p21	

			Caki-1	20 µM com tratamento 24h: aumento de 20%* células em G0- G1 e redução 20%* em S. Western Blotting: Aumento da expressão de p21	
			A-498	20 µM com tratamento 24h: aumento de 20%* células em G0- G1 e redução >20%* em S. Western Blotting: Aumento da expressão de p21	
		Apoptose – Níveis de Proteínas	786-O Caki-1 A-498	Western Blotting 20 µM com tratamento 24h: Aumento da clivagem caspase -3 e PARP e de Bax e redução de pP13K	

Várias são as possibilidades terapêuticas para o tratamento do câncer, incluindo radioterapia, imunoterapia, procedimento cirúrgico, quimioterapia, hormonioterapia, entre outros, sendo que a escolha da modalidade para o paciente varia de acordo com diversos fatores, tais como estágio de desenvolvimento e tipo de tumor (INCA, 2014). O objetivo do tratamento é curar, interromper ou minimizar o crescimento do tumor, bem como amenizar os sintomas causados pelo mesmo, com o intuito de maximizar a sobrevida do paciente (SOCIETY, 2014).

A quimioterapia, tratamento bastante utilizado, pode ser realizada com a administração de um ou mais agentes quimioterápicos e/ou ainda combinada ao procedimento cirúrgico e/ou radioterapia. Contudo, a utilização de fármacos isolados mostrou-se ineficaz em induzir respostas completas (INCA, 2016). As plantas medicinais representam uma das fontes mais ricas de compostos com atividade farmacológica, incluindo várias moléculas com atividade antitumoral.

A maioria dos estudos que envolvem *C. sympodialis*, trata da investigação/comprovação de atividade biológica relacionada ao trato respiratório, mas vários alcaloides bisbenzilisoquinolínicos de outras espécies têm se mostrado promissores na terapia antitumoral. Apesar disso, o potencial antitumoral dos alcaloides de *C. sympodialis* ainda foi pouco estudado. Existem diversos trabalhos publicados que relacionam alcaloides bisbenzilisoquinolínicos à atividade antitumoral, entretanto, a quantidade de estudos clínicos que possam levar estes alcaloides ou seus derivados ao uso terapêutico ainda é bastante escassa.

Os ABBI com maior representatividade nos estudos de atividade antitumoral foram a tetrândrina com ensaios contra 31 linhagens de diferentes tumores, seguido de neferina, com ensaios contra nove linhagens sendo que ambos apresentaram efeitos positivos promissores para a terapia de câncer.

Os ensaios de atividade antitumoral baseiam-se, em sua maioria, em avaliação de citotoxicidade, apoptose, autofagia, tamanho de tumor (*in vivo*) e sobrevida (*in vivo*).

Através da revisão sistemática acerca da atividade antitumoral relacionada aos ABBI, a tetrandrina, um ABBI do tipo VIII, foi a substância mais testada, sendo avaliada para 14 tumores, dos 16 tipos de câncer envolvidos na revisão da literatura, e abrangendo 31 diferentes linhagens, com os tumores de bexiga e glioma tendo o maior número de testes para quatro linhagens cada. Houve uma grande variedade entre os tipos de ensaios realizados e métodos empregados, destacando-se o ensaio de citotoxicidade, realizado em praticamente todos os estudos. Houve variação na CI_{50} da tetrandrina para linhagens tumorais entre 1,25 μM para o tumor de mama, especificamente para a linhagem MDA-MB-468 (HE; GAO; ZHANG; LUO *et al.*, 2011a), a 8,03 μM para o tumor hepático, especificamente para a linhagem BEL 7402 (QIU; SU; XIE; AI *et al.*, 2014) para os ensaios em que foram descritos os métodos empregados, sendo MTT o mais utilizado.

Considerando o proposto por Boik (BOIK, 2001), considera-se promissores, compostos puros com $CI_{50} < 4 \mu g/mL$, tornando a tetrandrina uma substância com potencial a ser usada no tratamento do tumor de bexiga, para a linhagem J82 (QIU; SU; XIE; AI *et al.*, 2014), de mama, para as linhagens MDA-MB-468 e MDA-MB-231 (HE; GAO; ZHANG; LUO *et al.*, 2011a) de cólon, para as linhagens HCT116 e SW480 (HE; GAO; ZHANG; LUO *et al.*, 2011a), e de pulmão, para a linhagem DU145 (HE; GAO; ZHANG; LUO *et al.*, 2011a) e (QIU; SU; XIE; AI *et al.*, 2014).

A avaliação da atividade antitumoral de ABBI vem sendo estudada desde 1965, quando Kupchan *et al.* testaram cinco ABBI isolados de *Cissampelos pareira* contra a linhagem de tumor de nasofaringe KB, em que foi realizada a avaliação da citotoxicidade apresentando DE_{50} : 1,1, 2,5 e 3,8 $\mu g/mL$ para cissampereina, 0,14 e 2,9 $\mu g/mL$ para L-curina, 0,17 e 2,6 $\mu g/mL$ para Isochondrodendrina, 0,12 e 0,93 para fangchinolina e 0,091 e 0,17 $\mu g/mL$ para d-tetrandrina, de resultados de ensaios sequenciais para cada ABBI em triplicata e/ou duplicatas independentes (KUPCHAN; PATEL; FUJITA, 1965). Com esses resultados, justifica-se a avaliação da atividade antitumoral *in vivo* contra outras linhagens.

A tetrandrina também foi testada quanto a sua atividade antitumoral para o tumor nasofaríngeo da linhagem NPC-TW 076 por Lin *et al.*, em que foi

encontrado um Cl_{50} 8,2 μ M, sendo que o alcaloide promoveu alteração morfológica celular no tratamento com 10 μ M por 48 horas. A tetrândrina também provocou indução de apoptose, avaliada através da expressão de marcadores tumorais como GADD153 e GRP78 (LIN; PENG; LIN; KUO *et al.*, 2016).

Cronologicamente falando, após o estudo de Kupchan *et al.* (KUPCHAN; PATEL; FUJITA, 1965), Kuroda *et al.* testaram 22 ABBI contra três linhagens tumorais de carcinoma de Ehrlich e colo uterino, sendo este o estudo com maior número de ABBI testados para uma mesma linhagem, HeLa, com os alcaloides que apresentaram menor DE_{50} sendo a tetrândrina e fangchinolina, com valores de 4,4 μ g/ml e 4,1 μ g/ml. O estudo também realizou ensaios *in vivo* em camundongos, com uma linhagem de carcinoma de Ehrlich, EAC, tendo sido testados os ABBI: tetrândrina, isotetrândrina, cepharantina, thalicberina e isotrilobina, com Cl_{50} : 50, 100, 30, 62,5 e 30 mg/kg/dia, respectivamente (KURODA; NAKAZAWA; KATAGIRI; SHIRATORI *et al.*, 1976). Nesse estudo, os autores relacionaram a atividade antitumoral à natureza do alcaloide, visto que foram testados os alcaloides na forma de base livre e também seus sais, como o sal dimetiodeto de alguns desses ABBI. Esta diferença na natureza do alcaloide pode justificar algumas das diferenças de potência antitumoral observadas, como a DE_{50} da tetrândrina (4,4 μ g/ml) e da tetrândrina dimetiodeto (>30 4,4 μ g/ml), para a linhagem HeLa. Para este estudo, entretanto, não foi possível estabelecer uma relação entre os tipos de esqueletos e melhores atividades antitumorais entre os ABBI estudados (KURODA; NAKAZAWA; KATAGIRI; SHIRATORI *et al.*, 1976).

A linhagem tumoral HeLa foi estudada também por Qiu *et al.*, em que a Cl_{50} foi de $\approx 7,9^*$ μ M com exposição a tetrândrina por 48h (valor aproximado determinado por gráfico), significativamente maior que o estudo de Kuroda *et al.* (KURODA; NAKAZAWA; KATAGIRI; SHIRATORI *et al.*, 1976; QIU; SU; XIE; AI *et al.*, 2014).

O tumor de bexiga foi estudado com tetrândrina sendo avaliada a sua atividade com quatro linhagens. Qiu *et al.* realizaram a triagem com testes de viabilidade celular com ensaio CCK-8, obtendo $Cl_{50} \approx 5^*$ μ M para a linhagem EJ e $\approx 2,7^*$ μ M para a linhagem J82 com exposição por 48h (valor aproximado

determinado por gráfico), sendo assim, mais potente para a linhagem J82 (QIU; SU; XIE; AI *et al.*, 2014). Outras duas linhagens, T24 e 5637, foram avaliadas quanto a ação do mesmo alcaloide sobre a autofagia, em que o tratamento de 10 μM por 24h induziu a formação de vacúolos autofágicos, ocorrência de autofagia por meio da identificação de marcadores moleculares, com aumento de LC3-II, tanto no uso somente de tetradrina, quanto na presença de BafA1, que é um inibidor da acidificação lisossômica, em que este resultado foi potencializado (KOU; LIU; XU; YANG *et al.*, 2017). Dessa forma, a tetradrina é uma possível alternativa na terapia de câncer de bexiga nessas quatro linhagens, com potencial de ser estudada para outras linhagens de outros tumores.

O osteosarcoma, nas linhagens MG63 e 143B, foi testado quanto à inibição por tetradrina, sendo que o ABBi apresentou resultados mais viáveis que 5-fluorouracil, e próximo de doxorrubicina por meio do ensaio de MTT, em que o CI_{50} para tetradrina foi 5,71 μM para MG63 e 2,17 μM para 143B, e para doxorrubicina 7,06 μM e 0,43 μM para MG63 e 143B, respectivamente. Os autores também observaram a inibição da formação de colônias e migração celular por tetradrina nas duas linhagens (HE; GAO; ZHANG; LUO *et al.*, 2011a).

A tetradrina também induz autofagia e apoptose, mediada por marcadores tumorais, tais como Beclin-1, LC3-I e LC3-II, citocromo C e Baf, observada através de microscopia e citometria de fluxo, com tratamento de 20 e 30 μM , reduzindo significativamente a quantidade de células e provocando alterações morfológicas nas mesmas para a linhagem CAL27, de tumor de boca humano (LIEN, J.-C.; LIN, M.-W.; CHANG, S.-J.; LAI, K.-C. *et al.*, 2017).

Yu *et al.* (YU; YU; CHEN; YANG *et al.*, 2014) também testaram a tetradrina para tumor oral, porém na linhagem HSC-3, obtendo resultados semelhantes de indução de apoptose, mediada por caspase-8, caspase-9 e caspase-3, e de autofagia por alguns dos marcadores moleculares estudados por Lien *et al.*, como, por exemplo, Beclin-1, LC-3-I e LC-3-II. O estudo atribuiu o efeito concentração/tempo dependente à apoptose por tetradrina e demonstrou a indução da formação de autofagossomos pela mesma através de

microscopia eletrônica (LIEN, J. C.; LIN, M. W.; CHANG, S. J.; LAI, K. C. *et al.*, 2017).

Yasukawa *et al.* apresenta o primeiro estudo *in vivo* com administração de tetrandrina via oral por indução de tumor por TPA e mezereina. Nesse estudo, 0,005% do alcaloide foi incorporado à dieta e observada redução do número de camundongos portadores de tumor em 30% a menos que os que não receberam a tetrandrina, além dos animais tratados terem menor número de tumores. O estudo também avaliou o efeito da tetrandrina quando administrada topicamente, sendo que os animais que receberam tratamento tiveram a acumulação epidérmica de TPA e mezereina inibida pelo alcaloide, associando a este a inibição da promoção do tumor (YASUKAWA; TAKIDO; TAKEUCHI; AKASU *et al.*, 1991).

Três linhagens de tumor renal já foram estudadas com ABBI. 786-0 foi testada com a tetrandrina *in vitro*, em que o ABBI foi capaz de aumentar a clivagem de caspase-3 e PARP, induzir a formação de autofagossomos (10 μ M por 6h), resultado reforçado pelo aumento de LC3-II (dose dependente), observada também no xenoenxerto (QIU; SU; XIE; AI *et al.*, 2014). A mesma linhagem também foi testada com o ABBI dauricina, em que esta reduziu a viabilidade celular, com aumento de 25% do ciclo celular na fase G₀ e G₁ e redução na fase S. Neste mesmo estudo, as linhagens Caki-1 e A498 também apresentaram resultado semelhante, apresentando 20% do ciclo celular na fase G₀ e G₁ e redução na fase S, com tratamento de dauricina na mesma concentração e tempo. Com esse tratamento foi possível observar aumento da clivagem de caspase-3 e PARP e Bax nas três linhagens e foram obtidos os valores de CI₅₀ 13,42 \pm 2,1, 8,46 \pm 1,3, 18,28 \pm 0,6 e 11,036 \pm 1,5, para as linhagens 786-0, Caki-1, A498 e ACHN, respectivamente (ZHANG; QIU; REN, 2018).

A stebisimina, (+) - 1,2 dehidrotelobina, (+) - 2' - norcocsulina e puertogalina B, isolados de *Anysocycla grandidieri* foram testados quanto a citotoxicidade nas linhagens tumorais UACC-257, de melanoma, A2780, de tumor de ovário, H460, de tumor de pulmão, MCF-7, de tumor de mama, sendo que apresentaram atividade moderada (+) - 1,2 dehidrotelobina e (+) - 2' - norcocsulina, para as quatro linhagens, com CI₅₀ entre 1 e 6 μ M, e stebisimina

e puertogalina B, com $Cl_{50} > 10 \mu M$, não sendo efetivas (LIU, Y.; HARINANTENAINA, L.; BRODIE, P. J.; SLEBODNICK, C. *et al.*, 2013).

O tumor de ovário também foi avaliado por Xu *et al.* em duas linhagens, A2780, testada por Liu *et al.*, conforme descrito anteriormente, e também SKOV3, em tratamento com o alcaloide neferina, sendo que a viabilidade celular foi investigada através de MTT, com $Cl_{50} 9,24 \mu M$, inibiu o crescimento de células tumorais, induziu autofagia, dependente de mTOR e também mediada por p38 MAPK e JNK, que tiveram seus níveis aumentados em concentração/tempo dependentes para a primeira linhagem citada. Com eficácia inferior a linhagem A2780, neferina também inibiu o crescimento celular da linhagem SKOV3 de maneira concentração dependente (LIU, YIXI; HARINANTENAINA, LIVA; BRODIE, PEGGY J.; SLEBODNICK, CARLA *et al.*, 2013b; XU; LI; LU; LI *et al.*, 2016).

A tetrandrina foi avaliada *in vitro* quanto a inibição de tumor de pâncreas, na linhagem PANC-1, sendo capaz de aumentar a clivagem de caspase-3 e PARP, e, através de CCK-8, 10 e 20 μM após 48h observou-se a redução significativa da viabilidade celular, tendo $Cl_{50} \approx 7,7^* \mu M$ (valor aproximado determinado por gráfico). Também foi observado o aumento de LC3-II, indicador de autofagia (QIU; SU; XIE; AI *et al.*, 2014).

O câncer de mama foi o testado com maior número de ABBI diferentes, tendo sido realizados ensaios com nove alcaloides diferentes dessa classe, sendo eles: (+) – coccuorbiculina A, tetrandrina, liensinina, isoliesinina, neferina, stebisimina, (+) - 1,2 dehidrotelobina, (+) – 2' – norcocsulina e puertogalina B. A (+) – coccuorbiculina A, isolada de *Cocculus orbiculatus*, foi testada quanto à citotoxicidade para as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231, apresentando $Cl_{50} > 30 \mu g/mL$, sendo assim, ineficiente contra as mesmas (CHANG, F. R.; WU, Y. C., 2005). Stebisimina, (+) - 1,2 dehidrotelobina, (+) – 2' – norcocsulina e puertogalina B foram avaliadas apenas para a linhagem MCF-7, apresentando $Cl_{50} > 10 \mu M$, $4,23 \pm 1,27 \mu M$, $> 1,11 < 3,33 \mu M$ e $Cl_{50} > 10 \mu M$, respectivamente, dessa forma, sendo ativos de forma moderada a (+) - 1,2 dehidrotelobina, (+) – 2' – norcocsulina, com menores Cl_{50} (LIU, Y.; HARINANTENAINA, L.; BRODIE, P. J.; SLEBODNICK, C. *et al.*, 2013). A tetrandrina foi testada para três linhagens de câncer de mama, em que foi

avaliada a citotoxicidade, e, para a linhagem MCF-7 apresentou $CI_{50} \approx 5,8^* \mu M$ (valor aproximado determinado por gráfico) (QIU; SU; XIE; AI *et al.*, 2014), para a linhagem MDA-MB-468, $CI_{50} 1,25 \mu M$ e para a linhagem MDA-MB-231, $CI_{50} 1,89 \mu M$ (HE; GAO; ZHANG; LUO *et al.*, 2011a), todos em tratamento por 48h, sendo, assim, mais potente para as duas últimas linhagens testadas. Fármacos antitumorais comumente utilizados, como, por exemplo, o paclitaxel e vincristina, apresentam faixa de CI_{50} 0,01 a 41,4 μM e 0,013 a 100 μM , o que confirma a eficácia da tetrandrina para as linhagens testadas (HE; GAO; ZHANG; LUO *et al.*, 2011a).

Mais recentemente, Zhang *et al.* avaliaram três ABBI quanto a viabilidade celular, indução de apoptose e angiogênese em quatro linhagens de tumor de mama. Identificaram uma redução significativa no número de colônias das linhagens MDA-MB-231, MDA-MB-436 e MCF-7, com tratamento com isoliensinina por 48 e 72h, com concentração variando de 5 a 40 μM , de maneira dose dependente. A liensinina e neferina também apresentaram redução de 40 e 60% de células viáveis, respectivamente, ambas com tratamento de 40 μM por 72h. Foi identificado que o efeito produzido pelo alcaloide é mediado pela parada do ciclo celular na fase G_1 , reduzindo a quantidade de células nas fases seguintes. Uma importante constatação foi feita a partir da avaliação da formação de ERO, em que a isoliensinina foi avaliada tanto em células cancerígenas das linhagens MDA-MB-231, MDA-MB-436 e MDA-MB-468, quanto em células saudáveis, MCF-10^a, e induziu a formação de ERO somente nas linhagens de câncer, apresentando uma resposta seletiva. A formação de ERO está relacionada a apoptose celular. (ZHANG; WANG; WU; LI *et al.*, 2015).

O tumor de pulmão também está entre os testados com maior número de ABBI diferentes, tendo sido realizada triagem com seis alcaloides dessa classe, stebisimina, (+) - 1,2 dehidrotelobina, (+) - 2' - norcocsulina e puertogalina B (LIU, YIXI; HARINANTENAINA, LIVA; BRODIE, PEGGY J.; SLEBODNICK, CARLA *et al.*, 2013a), neferina (POORNIMA; WENG; PADMA, 2014; SIVALINGAM; AMIRTHALINGAM; GANASAN; HUANG *et al.*, 2019) e tetrandrina (QIU; SU; XIE; AI *et al.*, 2014). (+) - 1,2 dehidrotelobina e (+) - 2' - norcocsulina apresentaram atividade moderada para a linhagem H460, com

CI₅₀ 2,18 ± 0,65 µM e >3,33<10 µM, respectivamente, tendo sido realizado apenas ensaio de citotoxicidade (LIU, Y.; HARINANTENAINA, L.; BRODIE, P. J.; SLEBODNICK, C. *et al.*, 2013). As linhagens H520, H661, H441 e A549 tiveram sua citotoxicidade avaliada após o tratamento de neferina por 48h, sendo obtidos os CI₅₀ 8, 14, 10 e 16 µM (valor aproximado determinado por gráfico). Esse mesmo estudo concluiu que o ABBI inibe a ativação de MAPK e parada do ciclo celular, com redução do volume de células na fase G₀-G₁ e seguintes quando comparado ao controle, sugerindo a ação da neferina na indução de apoptose na linhagem A549, de maneira dose dependente (POORNIMA; WENG; PADMA, 2014). Já a tetrandrina foi utilizada na triagem com a linhagem NCI-H460, apresentando CI₅₀ ≈ 7,7* µM (valor aproximado determinado por gráfico) no teste de citotoxicidade (QIU; SU; XIE; AI *et al.*, 2014).

A neferina também foi testada na carcinogênese de tumor de pulmão *in vivo*, induzido por dietilnitrosamina, em que os ratos foram divididos em seis grupos, com dietas de diferentes doses do ABBI, que variou de 10 mg/kg a 150 mg/kg, fracionada para doses até 20 mg/kg e única para a maior concentração (SIVALINGAM; AMIRTHALINGAM; GANASAN; HUANG *et al.*, 2019).

O glioma, um tumor cerebral, teve o maior número de testes com ensaios diferentes, sendo a linhagem U87 a mais estudada (WU; LAI; HU; LEI *et al.*, 2013) e a tetrandrina o único ABBI estudado. O primeiro registro de estudo nessa revisão foi em 2009, quando Chen *et al.* realizaram testes *in vitro* e *in vivo*. Nos ensaios *in vitro* foi possível identificar a indução de apoptose, com inibição da angiogênese em 52,7% com tratamento com 75 µM por 72h, para a linhagem RT-2. Os mesmos autores avaliaram, *in vivo*, a atividade da tetrandrina quanto a influência no tamanho os tumores e sobrevida dos animais que receberam tratamento frente ao grupo controle, sendo que os animais tratados com 150 mg/kg/dia do alcaloide apresentaram tumores reduzidos de forma significativa, além de sobreviverem por mais tempo que os tratados com dosagens inferiores e/ou controle (CHEN, Y.; CHEN, J. C.; TSENG, S. H., 2009).

Wu *et al.* testou a atividade da tetrandrina na linhagem U-87, sendo que o alcaloide foi capaz de inibir a proliferação celular, reduzir a expressão de

marcadores tumorais, além de reduzir a migração e invasão de células tumorais (WU; LAI; HU; LEI *et al.*, 2013).

Em 2015, Ma *et al.* avaliaram três linhagens diferentes de glioma, U-87, U-251 e SWO-38, demonstrando que, nos testes *in vitro*, foi observada, através de microscopia alterações morfológicas nas células tumorais e redução de células viáveis nas três linhagens tratadas com tetrandrina por 24h. Esses foram os únicos ensaios realizados com estas três linhagens. Para a linhagem U-87, os mesmos autores ainda avaliaram a indução de apoptose *in vivo* e *in vitro* com a redução na expressão de PCNA, indicativo de apoptose, redução do tamanho dos tumores nos animais tratados com 8 mg/mL de tetrandrina por 5 dias, e, assim como Wu *et al.* (2013), inibição da proliferação celular, com aumento de células na fase G₀-G₁ e redução nas fases seguintes (MA; ZHANG; LI; YE *et al.*, 2015).

He *et al.* testaram a tetrandrina contra as linhagens PC-3 e DU145 de câncer de próstata, que, através de ensaio MTT, apresentaram CI₅₀ 4,34 µM e 3,17 µM, respectivamente, o que sugere o melhor efeito para a segunda linhagem (HE; GAO; ZHANG; LUO *et al.*, 2011a), resultado mais significativo que o encontrado por Qiu *et al.*, em que, através de ensaio CCK-8, apresentaram CI₅₀ ≈ 7,8* µM e ≈ 2,62* µM (valor aproximado determinado por gráfico) para as mesmas linhagens. A partir dessa comparação é possível concluir que a tetrandrina apresenta resultado mais efetivo para a linhagem DU-145 que para PC-3. Este último autor ainda realizou o primeiro teste *in vivo* com a linhagem PC-3, em que a injeção subcutânea de 60 mg de tetrandrina/kg a cada dois dias em camundongos xenoenxertados resultou na diminuição significativa do tamanho do tumor quando comparados aos tumores dos animais que só receberam o veículo (QIU; SU; XIE; AI *et al.*, 2014).

Outro ABBI, a fangchinolina também foi estudada com duas linhagens de tumor de próstata, sendo que nos testes *in vitro*, através de MTT, foi observada a diminuição de viabilidade celular em mais de 90% para a linhagem PC-3 e 80% para a linhagem LnCap em tratamento por 72h, de maneira tempo dependente, com a concentração de 40 µM do alcaloide. A linhagem PC-3 ainda apresentou resultado positivo quanto à indução de parada celular, em que aumentou a quantidade de células na fase G₀ e G₁, e redução

nas seguintes. Esse mesmo alcaloide foi testado em ensaios *in vivo*, em que ratos xenoenxertados com a linhagem PC-3 receberam 25 ou 50 mg/kg de fangchinolina ou somente veículo, com a redução de aproximadamente 50% do tamanho do tumor nos animais que receberam 50 mg/kg do alcaloide após 30 dias de tratamento (LI; LU; SUN; FENG *et al.*, 2015), resultado semelhante ao do estudo citado anteriormente para a tetrandrina. Somente esses dois alcaloides foram testados *in vivo* para tumores de próstata através dessa busca, tendo os dois resultados promissores, indicando que esses ABBI podem ser alternativas ao desenvolvimento de tratamento de câncer relacionado a essas linhagens.

Dessa forma, a atividade antitumoral de ABBI, ainda que com estudos promissores, foi pouco explorada com relação a diversidade de linhagens tumorais e de alcaloides conhecidos. Apenas houve estudos com 31 ABBI, com esqueletos dos tipos I, II, V, VI, VIII, XI, XX, XXI, XXII, XXIII e XXVI, sendo o tipo VI com maior número de representantes, tendo sido estudados seis ABBI para tal atividade, seguido de V e VIII, com quatro representantes cada um. O tumor de cólon foi o que apresentou testes com maior variedade de ABBI quanto aos tipos de esqueleto, seguido do tumor de mama.

4.7. Triagem de Atividade Antitumoral

Os alcaloides fazem parte de um grupo de metabólitos cujas estruturas e funções são bastante variadas, inclusive serviram de base para o desenvolvimento de medicamentos importantes, incluindo antibacterianos, tais como metronidazol e as quinolonas (CUSHNIE; LAMB, 2005).

A tabela 04 apresenta os resultados de atividade citotóxica para as subfrações da fração de alcaloides terciários dos rizomas de *Cissampelos sympodialis*, em termos de IC_{50} obtida. Segundo o programa de triagem de drogas citotóxicas da Fiocruz BA, compostos puros com $IC_{50} < 4 \mu\text{g/mL}$ ou extratos/frações com $IC_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$ são considerados promissores (BOIK, 2001; SUFFNESS; PEZZUTO, 1990). Deste modo, dentre as amostras testadas, apenas a amostra de identificação P04 apresentou atividade citotóxica promissora contra a linhagem tumoral HCT116.

Tabela 04. Triagem da atividade antitumoral. Valores representam a CI_{50} obtida, e estão expressos em $\mu\text{g/mL}$

Amostras	HCT116	HepG2	MRC-5
FAT 00RZ	>50	>50	>50
P02	>50	>50	>50
	47,99		
P03	38,37 – 60,02 [#]	>50	>50
	23,68	31,99	31,37
P04	20,52 – 27,32 [#]	28,52 – 35,88 [#]	28,70 – 34,29 [#]
	41,75	46,54	36,51
P06	35,23 – 49,48 [#]	33,32 – 52,5 [#]	33,04 – 40,35 [#]
	33,91	45,95	31,72
P05	27,86 – 41,27 [#]	32,75 – 64,47 [#]	28,48 – 35,32 [#]
	0,53	0,11	2,11
DOX	0,37 – 0,76 [#]	0,09 – 0,14 [#]	1,44 – 3,08 [#]

[#]Intervalo de confiança de 95% para a estimativa da CI_{50} .

Resultado de atividade citotóxica das subfrações obtidas a partir da fração de alcaloides terciários dos rizomas de *C. sympodialis* frente as linhagens tumorais triadas.

Na tabela 04 temos representados valores de CI_{50} para a atividade citotóxica em linhagens de células tumorais (HepG2 e HCT116) *versus* não tumorais (MRC-5); os valores de CI_{50} (concentração inibitória média) e o respectivo intervalo de confiança de 95% obtido a partir de três experimentos independentes realizados em duplicata pelo método do Alamar blue após 72 horas de exposição com as células HCT116 (carcinoma de colón humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano) obtidos por regressão não-linear através do programa GraphPad Prisma versão 5.0. Doxorrubicina (DOX) foi usada como controle positivo.

O presente estudo avaliou a atividade antitumoral de compostos isolados de *Cissampelos sympodialis* contra as linhagens HCT116, de tumor de cólon e HepG2, de tumor hepático. Através da revisão de literatura dos estudos relacionados à atividade biológica, não foi identificado nenhum estudo com essas linhagens para ABBI comumente isolados da espécie estudada.

O tumor de cólon foi previamente estudado com a tetrandrina, em que esta, através de ensaios *in vivo*, foi capaz de reduzir o tamanho dos tumores em camundongos tratados com o ABBI nas concentrações 150 mg/kg/dia para a linhagem CT-26 (WU; CHEN; CHEN; LIN *et al.*, 2010) e 60 mg/kg/dia para a linhagem HCT116 (HE; GAO; ZHANG; LUO *et al.*, 2011b). Para esta primeira linhagem, o estudo *in vivo* também incluiu a avaliação da sobrevivência dos animais tratados comparada à dos controle, sendo que os camundongos tratados com 50 mg/kg/dia de tetrandrina sobreviveram por mais tempo que os tratados com dosagens inferiores e somente controle (WU; CHEN; CHEN; LIN *et al.*, 2010).

Nos estudos *in vitro*, foi possível observar redução de células viáveis, indução de apoptose, inibição da proliferação celular para as linhagens CT-26 (WU; CHEN; CHEN; LIN *et al.*, 2010) e HCT116 (HE; GAO; ZHANG; LUO *et al.*, 2011a). Três linhagens, CT-26, SW480 e HCT116, foram avaliadas quanto a citotoxicidade, sendo obtidos os resultados: 4,7 μM (WU; CHEN; CHEN; LIN *et al.*, 2010), 3,90 μM e 1,53 μM (HE; GAO; ZHANG; LUO *et al.*, 2011a), respectivamente, para o mesmo tipo de ensaio, que, inclusive, foi o mesmo realizado no presente estudo, em que a fração identificada como P04 apresentou média de CI_{50} 23,68 $\mu\text{g/mL}$, sendo caracterizada como promissora.

O tumor hepático foi estudado com três ABBI, segundo a revisão de literatura deste estudo, tetrandrina, neferina e (+) – coccuorbiculina A. A tetrandrina foi o primeiro ABBI estudado, tendo sido testada *in vitro* contra a linhagem HepG2, e apresentando resultados positivos, com CI_{50} $9 \pm 1 \mu\text{M}$, com tratamento por 48h, e indução de apoptose (YOO, S. M.; OH, S. H.; LEE, S. J.; LEE, B. W. *et al.*, 2002). A (+) – coccuorbiculina A, isolada de *Cocculus orbiculatus*, foi testada quanto à citotoxicidade para as linhagens HepG2 e Hep3B, apresentando CI_{50} $>30 \mu\text{g/mL}$, sendo assim, ineficiente contra as mesmas (CHANG, F.-R.; WU, Y.-C., 2005). Posteriormente, Liu *et al.* realizou testes *in vitro* em que a tetrandrina reduziu de forma significativa a viabilidade celular para as linhagens HepG2 e Huh7, induziu apoptose das células tumorais de maneira dose dependente, para as linhagens HepG2, BEL7402 e Huh7, associada a alteração morfológica, dados estes que foram reforçados com os estudos *in vivo* realizado em camundongos, em que houve redução do

tamanho dos tumores nos animais tratados com 100 mg/kg a cada 2 dias de tetrandrina.

Em 2012, um novo estudo avaliou a atividade da tetrandrina contra o tumor hepático com testes *in vitro* e *in vivo*, com indução de apoptose para as três linhagens HepG2, BEL7402 e Huh7, em tratamento com 5 μ M por 24h para os ensaios *in vitro*, e redução no tamanho do tumor e indução de apoptose com 50 mg/kg/dia por 20 dias e 80 μ M com tratamento por 24h, respectivamente, para Huh7 (GONG, KE; CHEN, CHAO; ZHAN, YAO; CHEN, YAN *et al.*, 2012). Mais recentemente, a tetrandrina foi novamente avaliada quanto a citotoxicidade, sendo obtidos $CI_{50} \approx 6,8^* \mu$ M (valor aproximado determinado por gráfico) e 8,03 μ M, com tratamento por 48h em células HepG2 e BEL-7402, respectivamente, o que sugere atuação mais potente da tetrandrina para a primeira linhagem citada (QIU; SU; XIE; AI *et al.*, 2014).

Além dos ABBI citados anteriormente, a neferina também foi avaliada *in vitro* quanto a atividade antitumoral para tumor hepático contra a linhagem Hep3B, sendo que foi capaz de reduzir em mais de 90% a viabilidade de células tumorais, além de ter provocado alterações morfológicas nas mesmas (YOON; KIM; YADUNANDAM; KIM *et al.*, 2013). Nenhum outro estudo avaliou a atividade deste ABBI contra linhagens de tumores hepáticos.

Apesar de estudos promissores sobre a atividade antitumoral de ABBI, nenhuma das frações triadas nesse estudo apresentou resultado promissor para a linhagem HepG2, tendo sido avaliada a citotoxicidade, em que CI_{50} foi maior que 30 μ g/mL para todas as amostras.

4.8. Triagem de Atividade Antibacteriana

A warifteína é o principal constituinte de *C. sympodialis*, já tendo sido relacionada com diversas atividades biológicas, entretanto, até então não tinha sido testada sua atividade contra bactérias e fungos. Outros ABBI já foram testados para atividade antibacteriana (Tabela 05), conforme apresentados os resultados da revisão sistemática acerca desta atividade. Os resultados da revisão sistemática estão tabulados a seguir.

Tabela 05. Estudos de ABBI com atividade antibacteriana.

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA					
Referência	ABBI	Concentração Testada	Microrganismo	Resultados Obtidos	Origem
Lohombo-Ekomba et al. 2004 Congo	Cicleanina	100 µg/100 µL DMSO	<i>Bacillus subtilis</i>	Zona de inibição: 16 mm Ref. Tetraciclina: 30 mm	<i>Albertisia villosa</i>
			<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Zona de inibição: 17 mm Ref. Tetraciclina: 30 mm	
			<i>Kebsiella pneumoniae</i>	Zona de inibição: 23 mm Ref. Tetraciclina: 30 mm	
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Zona de inibição: 18 mm Ref. Tetraciclina: 28 mm	
			<i>Salmonella typhi</i>	Zona de inibição: 19 mm Ref. Tetraciclina: 29 mm	
			<i>Streptococcus pyogenes</i>	Zona de inibição: 16 mm Ref. Tetraciclina: 32 mm	
Otshudi et al. 2005	Cocsolina		<i>Shigella sonnei</i>	CIM: 31,25 µg/mL Ref. Ciprofloxacino: 0,004	<i>Epinetrum villosum</i>
			<i>Shigella dysenteriae</i>	CIM: 125 Ref. Ciprofloxacino: 0,004	
			<i>Shigella flexneri</i>	CIM: 62,50 Ref. Ciprofloxacino: 0,004	
			<i>Shigella boydii</i>	CIM: 62,50 Ref. Ciprofloxacino: 0,004	
			<i>Campylobacter coli</i>	CIM: 31,25 µg/mL Ref. Ciprofloxacino: 0,004	
			<i>Campylobacter jejuni</i>	CIM: 15,62 µg/mL Ref. Ciprofloxacino: 0,004	
			<i>Vibrio cholerae</i>	CIM: 250 µg/mL Ref. Ciprofloxacino: 0,004	
			<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	CIM: 125 µg/mL Ref. Ciprofloxacino: 0,004	
			<i>Salmonella typhimurium</i>	CIM: 15,62 µg/mL Ref. Ciprofloxacino: 0,004	

			<i>Escherichia coli</i>	CIM: 31,25 µg/mL Ref. Ciprofloxacino: 0,004					
			<i>Enterococcus faecalis</i>	CIM: 500 µg/mL Ref. Ciprofloxacino: 0,004					
			<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CIM: 1000 µg/mL Ref. Ciprofloxacino: 0,004					
Patra et al. 2010	Tiliarina		<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6623)	Fortemente ativos. *Não apresentou a metodologia dos ensaios.					Tiliacora racemosa
	2' nortiliacarinina		<i>Escherichia coli</i> (VT3) <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)						
	2' nortiliacorina		<i>Vibrio cholerae</i> O1(NB2) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC15442)	Inativos. *Não apresentou a metodologia dos ensaios.					
Sureram et al. 2012	Tiliacarinina		<i>Mycobacterium tuberculosis</i> multirresistente (MDR-MTB)	CEPAS / CIM (µg/mL)					Tiliacora triandra
	2' nortiliacarinina			H37Ra	H37Ra	H37Ra – ETA-R	H37Ra – PAS-R	H37Ra – PZA-R	
				3,1	6,2	3,1	3,1	6,2	
				3,1	3,1	6,2	1,5	6,2	
				3,1	3,1	3,1	3,1	6,2	
Van Beek et al. 1983	Phaeantharina		<i>Bacillus subtilis</i>	CIM: 74 µg/mL					Phaeanthus ebracteolatus
			<i>Staphylococcus aureus</i>	CIM: 86 µg/mL					

Zuo et al. 2011	Tetrandrina		<i>Staphylococcus aureus (MRSA)</i>	CIM: 64/128 µg/mL Ref: Ampicilina 32/604 µg/mL; Cefazolina 64/128 µg/mL	<i>Não esclarecido.</i>
	Dimetiltetrandrina			CIM: 32/64 µg/mL Ref: Ampicilina 32/604 µg/mL; Cefazolina 64/128 µg/mL	
Sedmera et al. 1990	(-)-(1S,1'R) – 0,0 dimetilgrisabina		<i>Bacillus subtilis</i>	CIM: 62,5 ppm	<i>Phaeanthus vietnamensis Ban</i>

Quanto a triagem de atividade antimicrobiana da warifteína, as espécies de microrganismos testadas foram escolhidas de acordo a disponibilidade do banco de células do DeFar da UFVJM, sendo que algumas delas já haviam sido testadas por outros autores com outros ABBI.

A Tabela 06 apresenta as espécies bacterianas testadas e a CIM (quando efetivo) a partir das dosagens testadas.

Tabela 06. Espécies bacterianas triadas.

Espécie Bacteriana	Morfologia	Metabolismo	Parede Celular (Gram)	CIM (µM)
<i>Bacillus cereus</i>	Bacilo	Aeróbico	+	NE**
<i>Escherichia coli</i>	Bacilo	Aeróbico Anaeróbico facultativo	-	200
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Bacilo	Aeróbico Anaeróbico facultativo	-	200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacilo	Aeróbico Anaeróbico facultativo	-	NE**
<i>Proteus mirabilis</i>	Bacilo	Aeróbico Anaeróbico facultativo	-	NE**
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Coco	Aeróbico	+	200
<i>Salmonella typhimurium</i>	Bacilo	Aeróbico Anaeróbico facultativo	-	NE**

*Concentrações Testadas: 400 µM, 200 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM e 3,125 µM. ** NE: Não efetivo nas concentrações testadas.

Em se tratando das espécies bacterianas com as quais a warifteína foi efetiva não foi possível relacionar a atividade da War a características predominantes como metabolismo, forma ou composição da parede celular.

Tabela 07. Estudos de ABBI com atividade antifúngica.

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA					
Referência	ABBI	Concentração Testada	Microrganismo	Resultados Obtidos	Origem
Lohombo-Ekomba et al. 2004 Congo	Cicleanina	200 µg/100 µL DMSO	<i>Trichophyton longiformis</i>	Inibição: 100 % Ref. Cetoconazol: 100 %	<i>Albertisia villosa</i>
			<i>Candida albicans</i>	Inibição: 81,25 % Ref. Cetoconazol: 100 %	
			<i>Aspergillus flavis</i>	Inibição: 100 % Ref. Anfotericina B flucitosina: 100 %	
			<i>Microsperum canis</i>	Inibição: 93,9 % Ref. Cetoconazol: 100 %	
			<i>Fusarium solani var lycopersici-tomato</i>	Inibição: 91,86 % Ref. Benlate nabam: 100 %	
			<i>Emoniliform spp.</i>	Inibição: 100 % Ref. Benlate nabam: 100 %	
Otshudi et al. 2005	Cocsolina		<i>Candida albicans</i>	MIC: 31,25 µg/mL Ref. Fluconazol: 0,38	<i>Epinetrum villosum</i>

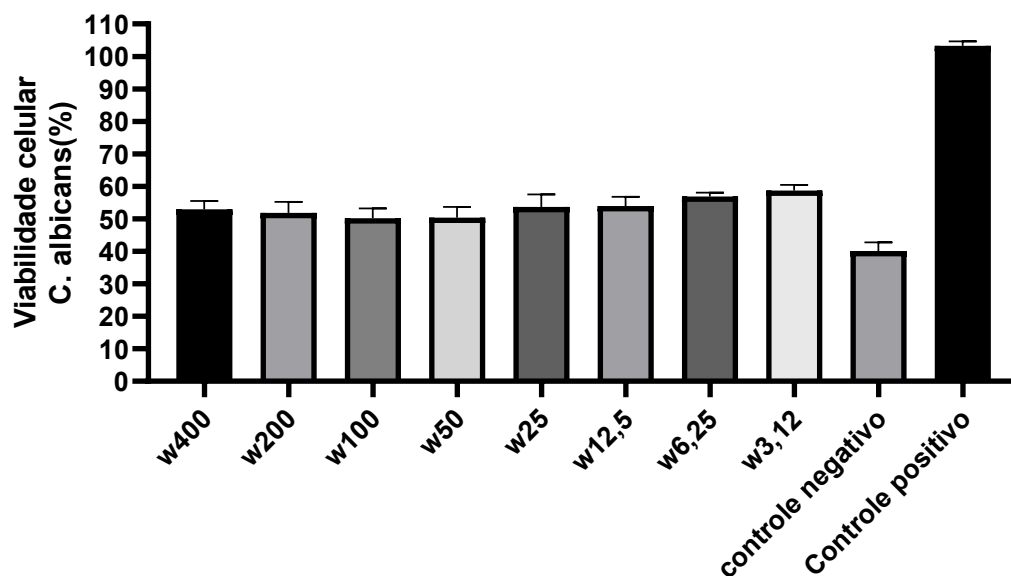


Gráfico 01. Resultado do ensaio de citotoxicidade de war contra *Candida albicans*. Os resultados mostrados são a média \pm desvio padrão do controle em warifteína de 3 réplicas biológicas. $*p < 0,05$. Shapiro-Wilk, ONEway ANOVA seguido do teste de Tukey's multiple comparisons test. A concentração de warifteína (wx) está expressa em $\mu\text{g/mL}$.

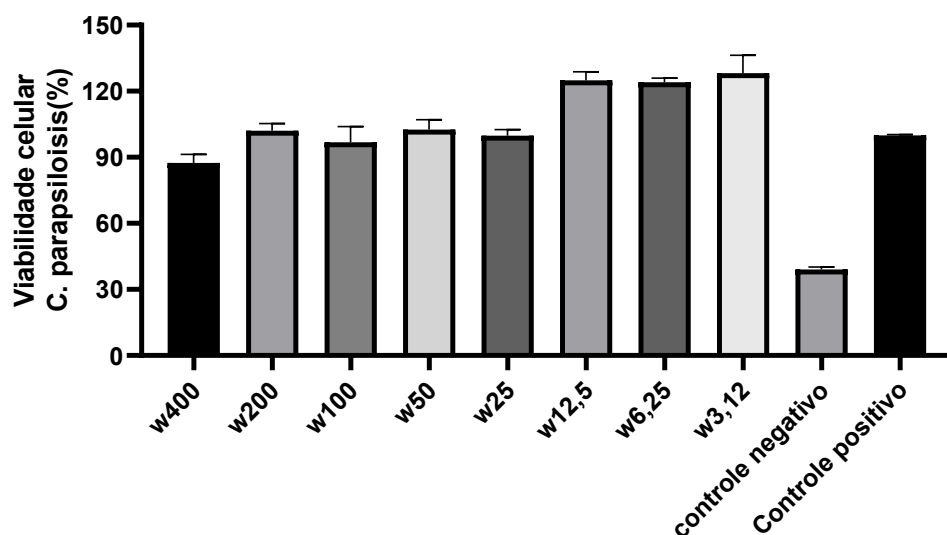


Gráfico 02. Resultado do ensaio de citotoxicidade de war contra *Candida parapsilosis*. Resultado do ensaio de citotoxicidade de war contra *Candida albicans*. Os resultados mostrados são a média \pm desvio padrão do controle em warifteína de 3 réplicas biológicas. $*p < 0,05$. Shapiro-Wilk, ONEway ANOVA seguido do teste de Tukey's multiple comparisons test. A concentração de warifteína (wx) está expressa em $\mu\text{g/mL}$.

A tabela 07 apresenta o resultado da revisão sistemática acerca dos estudos de atividade antifúngica associada a ABBI. Apenas dois ABBI foram testados, Cicleanina e Cocsolina, contra seis espécies fúngicas, *Trichophyton longiformis*, *Candida albicans*, *Aspergillus flavis*, *Microsperum canis*, *Fusarium solani* var *lycopersici-tomato* e *Emoniliform spp.*

LOHOMBO-EKOMBA *et al.* (2004) analisaram a atividade antimicrobiana da cicleanina isolada das cascas da raiz de *Albertisia villosa* na concentração de 100µg/ 100µL de DMSO contra cepas de *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Streptococcus pyogenes*. O halo de inibição médio para as bactérias testadas foi de 18 mm, sendo os menores halos pertencentes ao *Bacillus subtilis* e ao *Streptococcus pyogenes* com 16 mm, sugerindo que a cicleanina possui atividade antimicrobiana contra as seis bactérias testadas (LOHOMBO-EKOMBA; OKUSA; PENGE; KABONGO *et al.*, 2004).

A cocsolina isolada das raízes de *Epinetrum villosum* foi testada para atividade microbiana contra cepas de onze enterobactérias, *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*. O alcaloide apresentou uma atividade antimicrobiana fraca quando comparado ao extrato bruto e ao ciprofloxacino, sendo os melhores resultados para as cepas de *Campylobacter jejuni* e *Salmonella typhimurium* com a CIM de 15,62 µg/mL. (OTSHUDI; APERS; PIETERS; CLAEYS *et al.*, 2005)

PATRA e colaboradores (2010) fizeram a análise de três ABBI, tiliarina, 2'nortiliacorina, 2'nortiliacorina isolados dos frutos *Tiliacora racemosa* e testaram sobre as cepas de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, porém a metodologia realizada pelos autores não foi descrita. Eles concluíram que os três ABBI foram fortemente ativos contra as cepas de *B. subtilis*, *E. coli* e *S. aureus*, porém não tiveram atividade contra as cepas de *V. cholerae* e *P. aeruginosa* (PATRA; GHOSH; MUKHERJEE, 2010).

As raízes de *Tiliacora triandra* foram utilizadas por Sureram *et al.*, (2012), para o isolamento de três ABBI, tiliacorina, 2'nortiliacorina,

tiliacorina, que foram analisados para seu potencial antimicrobiano contra quatro cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistentes e uma cepa não virulenta, H37Ra (não virulenta), H37Rv e H37Rv- ETA-R-ATCC 35830 (resistente a etionamida), H37RV-PAS-R ATCC 35821 (resistente a p-aminosalicílico e a ácidos), H37Rv-PZA-R ATCC 35828 (resistente a pirazinamida). A concentração inibitória mínima variou de 1,5 a 6,2 µg/mL demonstrando um ótimo perfil como antimicrobiano e possivelmente um esqueleto para futuras drogas (SURERAM; SENADEERA; HONGMANEE; MAHIDOL *et al.*, 2012).

A phaeantharina isolada das cascas do caule de *Phaeanthus ebracteolatus* foi testada para atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, porém os resultados foram moderados apenas contra bactérias gram-positivas tendo o *Bacillus subtilis* uma concentração inibitória mínima de 74 µg/mL e o *Staphylococcus aureus* uma CIM de 86µg/mL (VAN BEEK; VERPOORTE; BAERHEIM SVENDSEN; SANTOS *et al.*, 1983).

Zuo e colaboradores (2011) avaliaram o efeito sinérgico da tetandrina e a dimetiltetrandrina (isolados das raízes de *Stephania tetrandra*) com antibióticos convencionais contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticiclina (MRSA). A tetandrina apresentou CIM: 64 µg/mL e uma Concentração Bactericida Mínima (CBM) de 128µg/mL e a dimetiltetandrina apresentou uma CIM de 32 µg/mL e uma CBM de 64µg/mL mostrando uma suscetibilidade do MRSA a tetandrina e dimetiltetandrina (ZUO; LI; WANG; HAN *et al.*, 2011).

A *Phaeanthus vietnamensis* é uma planta endêmica na parte central do Vietnã muito utilizada na medicina popular, o ABBI isolado do extrato das folhas 0,0'-dimetilgrisabina foi avaliado quanto ao seu potencial antimicrobiano contra o *Bacillus subtilis* e mostrando uma atividade antimicrobiana efetiva com um CIM de 62,5 µg/mL, (SEDMERA; NGHIA; VÁLKA; CAVÉ *et al.*, 1990) a metodologia utilizada não foi descrita pelos autores.

Albertisia villosa é um arbusto em que o decocto das cascas das suas raízes é utilizado contra a malária no Congo, pertence à família Menispermaceae que é uma família botânica que possui inúmeras espécies que tem alcaloides bisbenzilisoquinolínicos. A cicleanina foi isolada do extrato

das raízes de *Albertisia villosa* e foi avaliada quanto a capacidade antifúngica sobre seis fungos, *Trichophyton longiformis*, *Candida albicans*, *Aspergillus flavis*, *Microsperum canis*, *Fusarium solani var lycopersici-tomato*, *Emoniliform spp.*, a concentração utilizada foi de 200µg/ 100µL de DMSO. Os resultados obtidos variaram de 81,25% a 100% quanto á porcentagem de inibição dos fungos analisados, mostrando um grande potencial antifúngico (LOHOMBO-EKOMBA; OKUSA; PENGE; KABONGO *et al.*, 2004).

A cocsolina é um alcaloide bisbenzilisoquinolínico que foi isolado do extrato das raízes de *Epinetrum villosum* que é uma liana encontrada na República Democrática do Congo e na Angola. A cocsolina foi avaliada quanto a atividade antifúngica contra *Candida albicans*, o resultado obtido foi uma concentração inibitória mínima de 31,25 µg/mL (OTSHUDI; APERS; PIETERS; CLAEYS *et al.*, 2005).

Neste trabalho de pesquisa, para a avaliação da atividade antifúngica da warifteína foram utilizados a *Candida albicans* e a *Candida parapsilosis*.

A *Candida* faz parte da nossa microbiota normal, é encontrada no trato gatrointestinal e em regiões de mucosa, porém quando ocorre um desequilíbrio no organismo (imunossupressão, debilidade orgânica) é possível que este fungo possa causar graves infecções (SERRACARBASSA; DOTTO, 2003).

É comum se ter infecções fúngicas em pacientes imunodeprimidos, pacientes oncológicos, doentes internados em unidades de cuidados intensivos, e o principal fungo isolado de candidemias é a *C. albicans*, mas atualmente o foco também foi passado para I que tem sido o segundo fungo mais encontrado em candidemias, o que deve ocorrer pois ele tem capacidade de formar biofilme (MENEZES; JÚNIOR; CUNHA; CUNHA *et al.*, 2012)

É possível perceber pelos gráficos 01 e 02 que para as concentrações de warifteína utilizadas a que foi capaz de reduzir em cinquenta por cento a viabilidade da *C. albicans* foi 12,5µM, e para *C. parapsilosis* não se obteve concentração efetiva para inibir esta espécie. A warifteína demonstrou um potencial antifúngico contra *Candida albicans*.

A cicleanina inibiu o crescimento da *C. albicans* em 81,25% (LOHOMBO-EKOMBA; OKUSA; PENGE; KABONGO *et al.*, 2004) e a cocsolina apresentou uma concentração inibitória mínima de 31,25 µg/mL (OTSHUDI; APERS; PIETERS; CLAEYS *et al.*, 2005). Os dados da literatura corroboram com os dados encontrados pelo estudo.

Quando se avalia a atividade de extratos vegetais, considera-se significativa esta atividade para valores de CIM <100 µg/mL, moderada para CIM >100≤625 µg/mL e fraco quando CIM >625 µg/mL (Kuete, 2010).

Dessa forma, a atividade registrada para a warifteina pode ser considerada moderada para as espécies *E. coli*, *S. agalactiae* e *K. oxytoca* na mesma proporção. O resultado justifica e estimula investigações adicionais do uso de War e outros ABBI em tratamentos de doenças infecciosas.

5. CONCLUSÕES

- Foi possível isolar e caracterizar os alcaloides majoritários da fração de alcaloides terciários totais dos rizomas de *Cissampelos sympodialis*. Os alcaloides isolados foram a warifteína e a metilwarifteína. O constituinte mais abundante permitiu a confirmação de que se trata da warifteína.
- A revisão sistemática da literatura revelou que há uma escassez de estudos clínicos das atividades biológicas dessa classe e que ainda existem muitos constituintes e atividades não estudadas.
- Para a atividade antitumoral, o alcaloide mais estudado foi a tetrandrina, que demonstrou segundo a literatura pesquisada promissora atividade para os tumores de colo uterino, cólon e mama.
- Para a atividade antibacteriana, o alcaloide mais estudado segundo a literatura pesquisada foi a cocsolina, que demonstrou promissora atividade frente às espécies *Campylobacter jejuni* e *Salmonella typhimurium*.
- Para a atividade antifúngica, o alcaloide mais estudado segundo a literatura pesquisada foi a cicleanina, que demonstrou promissora atividade frente às espécies *Trichophyton longiformis*, *Aspergillus flavis* e *Emoniliform spp.*, com zonas de inibição comparadas às dos controles.
- Acerca das atividades biológicas testadas, os dados obtidos demonstram, pela primeira vez, a associação da atividade antitumoral a alcaloides isolados de *Cissampelos sympodialis*, bem como a atividade antibacteriana a War, sendo efetiva contra três espécies bacterianas, *E. coli*, *S. agalactiae* e *K. oxytoca*, na concentração 200 µM, resultados que subsidiam estudos adicionais que podem contrubuir para o desenvolvimento de medicamentos antitumorais e para tratamento de doenças infecciosas.

6. REFERÊNCIAS

AGRA, M. D. F.; FREITAS, P. F. D.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Rev Bras de Farmacog**, 17, p. 114-140, 2007.

AGUIRRE-GALVIS, L. E. Mass Spectra of Alkaloids from *Cissampelos pareira* L. **Acta Biol Colomb** 1, n. 4, p. 17-23, 1988.

AHMED, S. A.; GOGAL, R. M., JR.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [³H]thymidine incorporation assay. **J Immunol Methods**, 170, n. 2, p. 211-224, Apr 15 1994.

ALENCAR, J. L. **Isolamento e estudos das atividades relaxantes em musculatura lisa e esquelética de novos alcaloides de *Cissampelos sympodialis*** Eichl. 1994. MSc (MSc) - Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais, UFPB, João Pessoa.

ALMEIDA, R. N.; NAVARRO, D. S.; DE ASSIS, T. S.; DE MEDEIROS, I. A. et al. Antidepressant effect of an ethanolic extract of the leaves of *Cissampelos sympodialis* in rats and mice. **J Ethnopharmacol**, 63, n. 3, p. 247-252, Dec 1998.

ALVES, A. F.; VIEIRA, G. C.; GADELHA, F.; CAVALCANTE-SILVA, L. H. A. et al. Milonine, an Alkaloid of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) Inhibits Histamine Release of Activated Mast Cells. *Inflammation*, 40, n. 6, p. 2118-2128, Dec 2017.

BARBOSA FILHO, J. M.; AGRA, M. D. F.; THOMAS, G. Botanical, chemical and pharmacological investigation on *Cissampelos* species from Paraíba (Brazil). *Ciênc. cult. (São Paulo)*, 49, n. 5/6, p. 386-394, 1997.

BATISTA-LIMA, K.; RIBEIRO, R.; BALESTIERI, F.; THOMAS, G. et al. Anti-inflammatory activity of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) leaf extract. **Acta Farm. Bonaerense**, 20, p. 275-279, 2001.

BEZERRA-SANTOS, C. R.; VIEIRA-DE-ABREU, A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BANDEIRA-MELO, C. et al. Anti-allergic properties of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine. **Int Immunopharmacol**, 6, n. 7, p. 1152-1160, Jul 2006.

BOIK, J. C. **Natural Compounds in Cancer Therapy: Promising Nontoxic Antitumor Agents From Plants & Other Natural Sources** Oregon Medical Press, 2001. 0964828014.

CARLI, G. A. D. Parasitologia clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas. **Editora Atheneu**, 2001.

CAVALCANTE, H. M.; RIBEIRO, T. P.; SILVA, D. F.; NUNES, X. P. et al. Cardiovascular effects elicited by milonine, a new 8,14-dihydromorphinandienone alkaloid. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, 108, n. 2, p. 122-130, Feb 2011.

CAVALCANTI, A. C.; GOMES, A. N. P.; PORTO, N. M.; AGRA, M. F. et al. Pharmacognostic evaluation of *Cissampelos sympodialis* Eichl leaves. **S Afr J Bot**, 93, n. Copyright (C) 2019 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., p. 70-78, 2014. 10.1016/j.sajb.2014.03.014.

CHANG, F.-R.; WU, Y.-C. New bisbenzylisoquinolines, fatty acid amidic aporphines, and a protoberberine from Formosan *Cocculus orbiculatus*. **J Nat Prod**, 68, n. Copyright (C) 2019 U.S. National Library of Medicine., p. 1056-1060, 2005.

CHEN, Y.; CHEN, J. C.; TSENG, S. H. Tetrandrine suppresses tumor growth and angiogenesis of gliomas in rats. **Int J Cancer**, 124, n. 10, p. 2260-2269, May 15 2009.

CHEN, Y.; TSENG, S.-H. The potential of tetrandrine against gliomas. **Anti-Cancer Agents Med Chem.**, 10, n. Copyright (C) 2019 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., p. 534-542, 2010. 10.2174/187152010793498609.

CHIPINGA, J. V.; KAMANULA, J. F.; MOYO, P. B. B. Efficacy of *Pterocarpus angolensis* crude extracts against *Candida krusei*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli*. **Malawi Med J**, 30, n. 4, p. 219-224, Dec 2018.

CORTES, S. F.; DEALENCAR, J. L.; THOMAS, G.; BARBOSA, J. M. Spasmolytic actions of warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from the root bark of *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae). **Phytother Research**, 9, n. 8, p. 579-583, 1995.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F. et al. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Rev Virt de Química**, 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

CUSHNIE, T. P.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **Int J Antimicrob Agents**, 26, n. 5, p. 343-356, Nov 2005.

DE FREITAS, M. R.; CORTES, S. D. F.; BARBOSA FILHO, J. M. Modification of Ca²⁺ metabolism in the rabbit aorta as a mechanism of spasmolytic action of warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). **J Pharm Pharmacol.**, 48, n. Copyright (C) 2019 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., p. 332-336, 1996.

DE FREITAS, M. R.; DE ALENCAR, J. L.; DA-CUNHA, E. V. L.; BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Milonine, an 8,14-dihydromorphinandienone alkaloid from leaves of *Cissampelos sympodialis*. **Phytochem**, 40, n. 5, p. 1553-1555, 1995/11/01/ 1995.

DE LIRA, G. A.; DE ANDRADE, L. M.; FLORENCIO, K. C.; DA SILVA, M. S. et al. Roraimine: a bisbenzylisoquinoline alkaloid from *Cissampelos sympodialis* roots. **Fitoter**, 73, n. 4, p. 356-358, Jul 2002.

DIAS, C. S. **Isolamento e Identificação de Alcaloides Bisbenzylisoquinolínicos de *Chondodendron platyphyllum* A. ST. Hil (Miers), e Avaliação da Atividade Vasorelaxante em Artérias de Resistência.** 1999. Mestrado (MSc) - Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais, UFPB, João Pessoa.

EICHLER, A. W. **Flora Brasiliensis** v. 13, p. 121, 1887.

FALCÃO, H. D. S.; LIMA, I. O.; SANTOS, V. L. D.; DANTAS, H. D. F. et al. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. **Rev Bras de Farmacognosia**, 15, p. 381-391, 2005.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quím Nova**, 30, p. 374-381, 2007.

GONG, K.; CHEN, C.; ZHAN, Y.; CHEN, Y. et al. Autophagy-related gene 7 (ATG7) and reactive oxygen species/extracellular signal-regulated kinase regulate tetrandrine-induced autophagy in human hepatocellular carcinoma. **J Biol Chem**, 287, n. 42, p. 35576-35588, Oct 12 2012.

GUHA, K. P.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. Bisbenzylisoquinoline Alkaloids--A Review. **J Nat Prod**, 42, n. 1, p. 1-84, Jan 1979.

HE, B.-C.; GAO, J.-L.; ZHANG, B.-Q.; LUO, Q. et al. Tetrandrine inhibits Wnt/ β -catenin signaling and suppresses tumor growth of human colorectal cancer. **Mol. Pharmacol.**, 79, n. Copyright (C) 2019 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., p. 211-219, 2011a. 10.1124/mol.110.068668.

HENNION, M. C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. **J of Chromat** 856, n. 1-2, p. 3-54, 1999.

INCA, B. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativas 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer, p. 126 p, 2014.

INCA, B. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativas 2016: Incidência de Câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer, 2016.

INCA, B. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção a Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativa 2020: Incidência de câncer no Brasil Instituto Nacional de Câncer, 2019.

INSTITUTE, C. A. L. S. NCCLS. Manual Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria M07-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. M07-A10: 87 p. 2015.

JIN, Q.; YANG, D.; DAI, Z.; KHAN, A. et al. Antitumor aporphine alkaloids from *Thalictrum wangii*. **Fitoter**, 128, n. Copyright (C) 2019 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., p. 204-212, 2018. 10.1016/j.fitote.2018.05.012.

KALAI SELVI, S.; VINOTH, A.; VARADHARAJAN, T.; WENG, C. F. et al. Neferine augments therapeutic efficacy of cisplatin through ROS- mediated non-canonical autophagy in human lung adenocarcinoma (A549 cells). **Food Chem Toxicol**, 103, n. Copyright (C) 2019 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., p. 28-40, 2017. 10.1016/j.fct.2017.02.020.

KOU, B.; LIU, W.; XU, X.; YANG, Y. et al. Autophagy induction enhances tetrandrine-induced apoptosis via the AMPK/mTOR pathway in human bladder cancer cells. **Oncol Rep**, 38, n. Copyright (C) 2019 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., p. 3137-3143, 2017. 10.3892/or.2017.5988.

KUETE, V. Potential of Cameroonian plants and derived-products against microbial infections. A review. **Planta Med**. 76, 1479-1491.

KUPCHAN, S. M.; PATEL, A. C.; FUJITA, E. Tumor inhibitors. VI. Cissampareine, new cytotoxic alkaloid from *Cissampelos pareira*. Cytotoxicity of bisbenzylisoquinoline alkaloids. **J Pharm Sci**, 54, n. 4, p. 580-583, Apr 1965.

KURODA, H.; NAKAZAWA, S.; KATAGIRI, K.; SHIRATORI, O. et al. Antitumor effect of bisbenzylisoquinoline alkaloids. **Chem Pharm Bull** (Tokyo), 24, n. Copyright (C) 2019 U.S. National Library of Medicine., p. 2413-2420, 1976.

LI, D.; LU, Y.; SUN, P.; FENG, L.-X. et al. Inhibition on Proteasome β 1 Subunit Might Contribute to the Anti-Cancer Effects of Fangchinoline in Human Prostate

Cancer Cells. **PLoS One**, 10, n. Copyright (C) 2019 U.S. National Library of Medicine., p. e0141681, 2015.

LI, Q.; XIANG, J.; TANG, Y. Non-Flat Bisbenzylisoquinoline Alkaloid Fangchinoline As a Class of Potent G-Quadruplex Stabilizer with Anti-cancer Activity. **Chin J Chem.**, 33, n. Copyright (C) 2019 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., p. 1041-1048, 2015. 10.1002/cjoc.201400841.

LIEN, J.-C.; LIN, M.-W.; CHANG, S.-J.; LAI, K.-C. et al. Tetrandrine induces programmed cell death in human oral cancer CAL 27 cells through the reactive oxygen species production and caspase-dependent pathways and associated with beclin-1-induced cell autophagy. **Environ Toxicol**, 32, n. Copyright (C) 2019 U.S. National Library of Medicine., p. 329-343, 2017.

LIN, Y. J.; PENG, S. F.; LIN, M. L.; KUO, C. L. et al. Tetrandrine Induces Apoptosis of Human Nasopharyngeal Carcinoma NPC-TW 076 Cells through Reactive Oxygen Species Accompanied by an Endoplasmic Reticulum Stress Signaling Pathway. **Molecules**, 21, n. 10, Oct 12 2016.

LINGEMAN, H.; HOEKSTRA-OUSSOREN, S. J. F. Particle-loaded membranes for sample concentration and/or clean-up in bioanalysis. **J Chromat B.**, 689, n. 1, p. 221-237, 1997.

LIU, C. M.; KAO, C. L.; WU, H. M.; LI, W. J. et al. Antioxidant and anticancer aporphine alkaloids from the leaves of *Nelumbo nucifera* Gaertn. cv. Rosa-plena. **Molecules**, 19, n. 11, p. 17829-17838, Nov 3 2014.

LIU, R.; ZHANG, Y.; CHEN, Y.; QI, J. et al. A novel calmodulin antagonist O-(4-ethoxyl-butyl)-berbamine overcomes multidrug resistance in drug-resistant MCF-7/ADR breast carcinoma cells. **J Pharm Sci**, 99, n. 7, p. 3266-3275, Jul 2010.

LIU, Y.; HARINANTENAINA, L.; BRODIE, P. J.; SLEBODNICK, C. et al. Structure elucidation of antiproliferative bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Anisocycla grandidieri* from the Madagascar dry forest. **Magn Reson Chem**, 51, n. 9, p. 574-579, Sep 2013.

LOHOMBO-EKOMBA, M. L.; OKUSA, P. N.; PENGE, O.; KABONGO, C. et al. Antibacterial, antifungal, antiplasmodial, and cytotoxic activities of *Albertia villosa*. **J Ethnopharmacol**, 93, n. 2-3, p. 331-335, Aug 2004.

MA, J. W.; ZHANG, Y.; LI, R.; YE, J. C. et al. Tetrandrine suppresses human glioma growth by inhibiting cell survival, proliferation and tumour angiogenesis through attenuating STAT3 phosphorylation. **Eur J Pharmacol**, 764, p. 228-239, Oct 5 2015.

MEDEIROS, A. F. D. **Aplicação de Cromatografia a Líquida de Alta Eficiência Preparativa para Isolamento de Alcaloides de *Cissampelos sympodialis* Eichl, e Estudo Farmacocinético Preliminar de Warifteína.** 2013. PhD (PhD) - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, UFPB, João Pessoa, PB, Brasil.

MELO, P. S.; CAVALCANTE, H. M. D. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DINIZ, M. D. F. F. M. et al. Warifteine and milonine, alkaloids isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl: cytotoxicity on rat hepatocyte culture and in V79 cells. **Toxicol Lett.**, 142, n. Copyright (C) 2019 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., p. 143-151, 2003. 10.1016/S0378-4274(03)00064-X.

MENEZES, E. A.; JÚNIOR, A. A. D. V.; CUNHA, F. A.; CUNHA, M. C. D. S. O. et al. Identificação molecular e suscetibilidade antifúngica de *Candida parapsilosis* isoladas no Ceará, Brasil. **J Bras Patol Med Lab**, 48, n. 6, p. 415-420, 2012.

MISHRA, B. B.; SINGH, R. K.; SRIVASTAVA, A.; TRIPATHI, V. J. et al. Fighting Against Leishmaniasis: Search of Alkaloids as Future True Potential Anti-Leishmanial Agents. **MINI-REVIEWS IN MEDICINAL CHEMISTRY**, 9, n. 1, p. 107-123, 2009.

MOHER, D.; LIBERATI, A.; TETZLAFF, J.; ALTMAN, D. G. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. **PLoS Med**, 6, n. 7, 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 16 1983.

MUKHERJEE, R.; KEIFER, P. A. Warifteine and methylwarifteine: ^1H and ^{13}C assignments by two-dimensional NMR spectroscopy. **Magn Reson Chem**, 41, n. 3, p. 213-218, 2003b.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2019. **J of Nat Prod**, 79 (3), p. 629-661, 2020.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur J Biochem**, 267, n. 17, p. 5421-5426, Sep 2000.

OTSHUDI, A. L.; APERS, S.; PIETERS, L.; CLAEYS, M. et al. Biologically active bisbenzylisoquinoline alkaloids from the root bark of *Epinetrum villosum*. **J of Ethnoph**, 102, p. 89-94, 2005.

PATRA, A.; GHOSH, S.; MUKHERJEE, B. Structure elucidation of two new bisbenzylisoquinoline alkaloids and NMR assignments of the alkaloids from the

fruits of *Tiliacora racemosa*. **Magn Reson Chem**, 48, n. 10, p. 823-828, Oct 2010.

POORNIMA, P.; WENG, C. F.; PADMA, V. V. Neferine, an alkaloid from lotus seed embryo, inhibits human lung cancer cell growth by MAPK activation and cell cycle arrest. **BioFact**, 40, n. Copyright (C) 2019 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., p. 121-131, 2014. 10.1002/biof.1115.

QIU, W.; SU, M.; XIE, F.; AI, J. et al. Tetrandrine blocks autophagic flux and induces apoptosis via energetic impairment in cancer cells. **Cell Death Dis**, 5, p. e1123, Mar 13 2014.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JADIM, I. C. S. F. Métodos de extração e ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Quim. Nova**, 24, n. 1, p. 68-76, 2001.

ROCHA, C.; REYNOLDS, N.; SIMONS, M. Resistencia emergente a los antibióticos: una amenaza global y un problema crítico en el cuidado de la salud. **Rev Per Med Exper y Salud Púb**, 32, p. 139-145, 2015.

SEDMERA, P.; NGHIA, N.; VÁLKA, I.; CAVÉ, A. et al. A New Bisbenzylisoquinoline Alkaloid from *Phaenthus vietnamensis* and Its Antibacterial Activity. **Heterocyc**, 30, p. 205-209, 1990.

SERRACARBASSA, P. D.; DOTTO, P. Endoftalmite por *Candida albicans*. **Arq Bras Oftalmol**, 66, p. 701-707, 2003.

SIVALINGAM, K.; AMIRTHALINGAM, V.; GANASAN, K.; HUANG, C. Y. et al. Neferine suppresses diethylnitrosamine-induced lung carcinogenesis in Wistar rats. **Food Chem Toxicol**, 123, p. 385-398, Jan 2019.

SOCIETY, A. C. Cancer Facts & Figures 2014. Atlanta, GA: **Amer Cancer Soc Inc.**: 68 p. 2014.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays related to cancer drug discovery. In: HOSTETTMANN, K. (Ed.). *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*. London: **Acad Press**, 1990. p. 71-133.

SURERAM, S.; SENADEERA, S. P.; HONGMANEE, P.; MAHIDOL, C. et al. Antimycobacterial activity of bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Tiliacora triandra* against multidrug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Bioorg Med Chem Lett**, 22, n. 8, p. 2902-2905, Apr 15 2012.

THOMAS, G.; BURNS, F.; PYNE, S.; PYNE, N. J. Characterization of an extract from the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl. on the spontaneous tone of isolated trachea. **Phytother Res**, 11, n. Copyright (C) 2019 American Chemical

Society (ACS). All Rights Reserved., p. 496-499, 1997. 10.1002/(SICI)1099-1573(199711)11:7<496::AID-PTR137>3.0.CO;2-7.

UCHE, F. I.; DRIJFHOUT, F. P.; MCCULLAGH, J.; RICHARDSON, A. et al. Cytotoxicity Effects and Apoptosis Induction by Bisbenzylisoquinoline Alkaloids from *Triclisia subcordata*. **Phytother Res**, 30, n. Copyright (C) 2019 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., p. 1533-1539, 2016. 10.1002/ptr.5660.

VAN BEEK, T. A.; VERPOORTE, R.; BAERHEIM SVENDSEN, A.; SANTOS, A. C. et al. Revised structure of pheantharine. **J Nat Prod**, 46, n. Copyright (C) 2019 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., p. 226-231, 1983. 10.1021/np50026a017.

WHO. Agency for Research on cancer: Estimated Cancer Incidence, mortality and Prevalence Worldwide. 2012.

WU, C.-Z.; LAI, L.; HU, X.; LEI, R.-R. et al. Synthesis and antitumor activity of tetrandrine derivatives. **J Of Asian Nat Prod Res**, 15, n. 9, p. 993-1002, 2013.

WU, J. M.; CHEN, Y.; CHEN, J. C.; LIN, T. Y. et al. Tetrandrine induces apoptosis and growth suppression of colon cancer cells in mice. **Cancer Lett**, 287, n. 2, p. 187-195, Jan 28 2010.

XU, L.; LI, Y.; LU, S.; LI, J. et al. Neferine induces autophagy of human ovarian cancer cells via p38 MAPK/ JNK activation. **Tumour Biol**, 37, n. Copyright (C) 2019 U.S. National Library of Medicine., p. 8721-8729, 2016.

YASUKAWA, K.; TAKIDO, M.; TAKEUCHI, M.; AKASU, M. et al. Cepharanthine inhibits two-stage tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate and mezerein on skin tumor formation in mice initiated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. **J Cancer Res Clin Oncol**, 117, n. Copyright (C) 2019 U.S. National Library of Medicine., p. 421-424, 1991.

YOO, S.-M.; OH, S.-H.; LEE, S.-J.; LEE, B.-W. et al. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by tetrandrine in HepG2 cells. **J Ethnopharmacol.**, 81, n. Copyright (C) 2019 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., p. 225-229, 2002. 10.1016/S0378-8741(02)00082-X.

YOON, J. S.; KIM, H. M.; YADUNANDAM, A. K.; KIM, N. H. et al. Neferine isolated from *Nelumbo nucifera* enhances anti-cancer activities in Hep3B cells: molecular mechanisms of cell cycle arrest, ER stress induced apoptosis and anti-angiogenic response. **Phytomed**, 20, n. 11, p. 1013-1022, Aug 15 2013.

YU, F. S.; YU, C. S.; CHEN, J. C.; YANG, J. L. et al. Tetrandrine induces apoptosis Via caspase-8, -9, and -3 and poly (ADP ribose) polymerase dependent pathways and autophagy through beclin-1/ LC3-I, II signaling

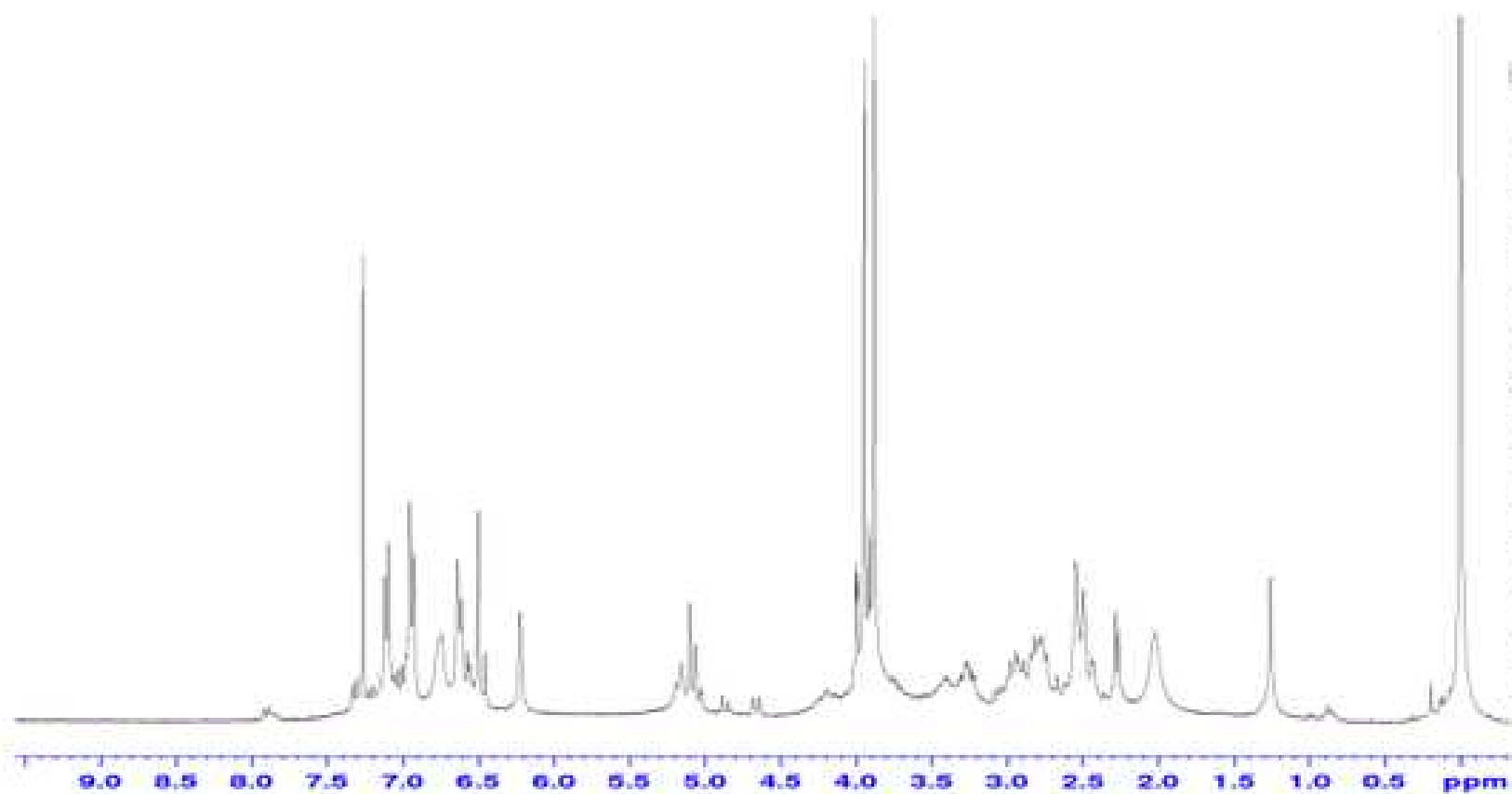
pathways in human oral cancer HSC-3 cells. **Environ Toxicol**, 31, n. 4, p. 395-406, Apr 2014.

ZHANG, S.; QIU, J.; REN, Y. Dauricine inhibits viability and induces cell cycle arrest and apoptosis via inhibiting the PI3K/Akt signaling pathway in renal cell carcinoma cells. **Mol Med Rep**, 17, n. Copyright (C) 2019 U.S. National Library of Medicine., p. 7403-7408, 2018.

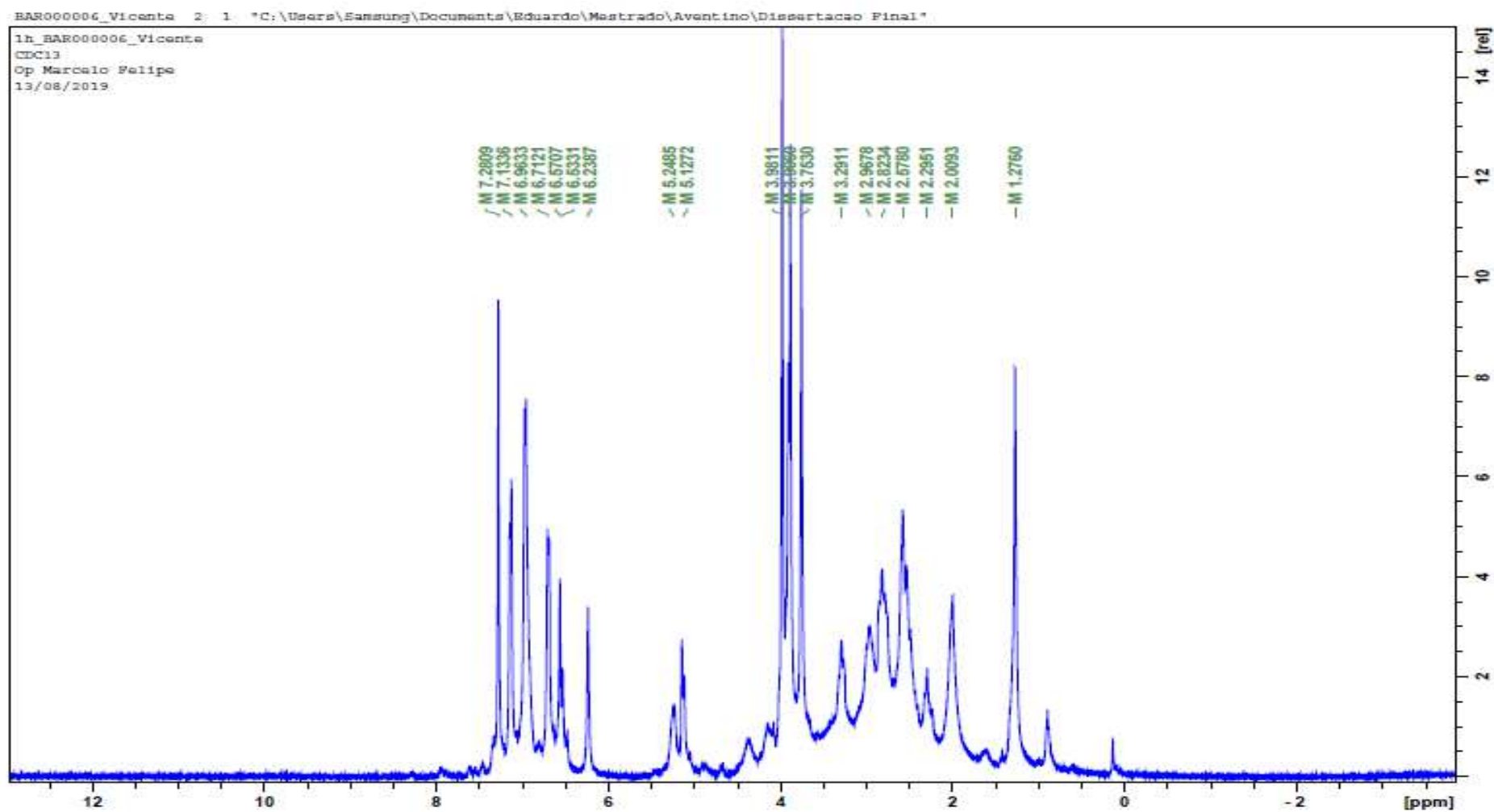
ZHANG, X.; WANG, X.; WU, T.; LI, B. et al. Isoliensinine induces apoptosis in triple-negative human breast cancer cells through ROS generation and p38 MAPK/JNK activation. **Sci Rep**, 5, p. 12579, Jul 29 2015.

ZUO, G. Y.; LI, Y.; WANG, T.; HAN, J. et al. Synergistic antibacterial and antibiotic effects of bisbenzylisoquinoline alkaloids on clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Molecules**, 16, n. 12, p. 9819-9826, Nov 25 2011.

ANEXOS



Espectro de RMN de ^1H da subfração 5.

Espectro de RMN de ^1H da subfração 6